

**Fajtafüggő élettani és transzkriptszintű változások szárazságstressz
hatására búzában**

Ph.D. értekezés

Szécsényi Mária

Témavezető: Dr. Györgyey János

MTA Szegedi Biológiai Központ, Növénybiológiai Intézet
Biológia Doktori Iskola
SZTE TTIK

Szeged

2010

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés.....	7
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. „Ám eső nem esett többé, aszály dívott mindörökké.”	10
3.2. A vízhiány érzékelése.....	10
3.3. Az abszcizinsav.....	11
3.3.1. Az ABS jellemzői és szerepe	11
3.3.2. Az ABS bioszintézise	13
3.4. A szárazságstresszhez kapcsolódó jelátvitel.....	14
3.5. ABS által szabályozott gének és szerepük a stresszválaszban	15
3.5.1. Ozmotikumok szintézisének enzimei	15
3.5.2. Védőfunkciót ellátó fehérjék - LEA fehérjék, molekuláris chaperonok	16
3.5.2.1. LEA fehérjék.....	16
3.5.2.2. Molekuláris chaperonok - hősokkfehérjék (Hsp).....	17
3.5.3. A növényi sejt membránjainak hidraulikus konduktivitását növelő transzport- fehérjék	18
3.5.4. Az oxidatív stressz kivédésében szerepet játszó proteinek.....	20
3.5.5. A proteinbontásban részt vevő enzimek - proteázok.....	22
3.6. Az ABS-független utak jelentősége a stresszválaszban	22
3.7. Fotoszintézis aszályos körülmények között	23
3.8. Az aszkorbát-glutation ciklus szerepe az oxidatív stressz mint másodlagos stresszfaktor kivédésében	24
3.9. A gyökér szerepe az aszályhoz való alkalmazkodásban	27
3.10. A búza transzkriptomikája	29
4. Célkitűzés	31
5. Anyag és módszer	32
5.1. A munkánk során gyakran használt oldatok összetétele.....	32
5.2. A munkánk során használt búzafajták rövid ismertetése	32
5.3. Növények nevelése.....	33
5.3.1. Búzafajták nevelése perlitben	33
5.3.2. Búzafajták nevelése homok-perlit 2:1 arányú keverékében	33
5.4. Molekuláris vizsgálatok.....	34

5.4.1. cDNS-microarray vizsgálat	34
5.4.2. Oligonukleotid-microarray vizsgálat	35
5.4.3. Aminósav-szekvenciák összehasonlítása.....	38
5.4.4. cDNS-szintézis; valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripció PCR (RT-qPCR).....	38
5.5. Élettani mérések	40
5.5.1. Relatív víztartalom meghatározása	40
5.5.2. Relatív prolintartalom meghatározása	40
5.5.3. Klorofill- és karotinoidtartalom meghatározása.....	41
5.5.4. Gázcsere-vizsgálatok	41
5.5.5. ABS-tartalom meghatározása	42
5.6. Statisztika.....	42
6. Eredmények	43
6.1. Két, szárazságstresszre toleráns búzafajta összehasonlítása hosszú távú, mérsékelt vízhiány során	43
6.1.1. Növekedési paraméterek.....	43
6.1.2. A <i>P5CS</i> gén kifejeződésének mint szárazságstressz-indikátornak a nyomon követése	44
6.1.3. Gének kifejeződésének vizsgálata árpa cDNS-microarray-vel	45
6.1.3.1. Klaszteranalízis – hasonló kifejeződés-mintázatú gének csoportosítása	46
6.1.3.2. Az indukált gének funkció szerinti csoportosítása	49
6.1.3.3. A microarray-eredmények validálása valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel: a glutation-transzferáz géncsalád	50
6.2. Stressztoleranciájukban eltérő jellegű búzafajták összehasonlítása korlátozott vízellátás során.....	52
6.2.1. Növekedési paraméterek.....	54
6.2.2. Relatív víz- és prolintartalom, valamint a <i>P5CS</i> gén kifejeződésének nyomon követése levélben	55
6.2.3. A fotoszintetikus pigmentek mennyiségének és összetételének alakulása.....	57
6.2.4. Fotoszintetikus paraméterek alakulása – nettó CO ₂ asszimiláció, sztóma- konduktancia, transzspirációs ráta, vízhasznosítási hatékonyság	58
6.2.5. ABS-szintek gyökérben	63
6.2.6. A microarray-hibridizáció eredményének összefoglalása	64
6.2.6.1. A szárazságstressz által indukált gének funkció szerinti osztályozása.....	66

6.2.6.2. ABS-szintet követő gének – az oligo-chip validálása	67
6.2.6.3. A szárazságstresszre toleráns és érzékeny búzafajták között különbséget mutató gének	68
6.3. Az AsA-GSH ciklus génjeinek transzkriptszint-változásai a szárazságra toleráns Plainsman V, illetve az érzékeny Cappelle Desprez leveleiben	70
6.3.1. Növekedési paraméterek.....	70
6.3.2. A <i>P5CS</i> gén kifejeződésének mint szárazságstressz-indikátornak a nyomon követése	71
6.3.3. Az AsA-GSH ciklus enzimeinek típusai és génjeik hasonlósága	72
6.3.4. Génkifejeződések változása szárazságstressz esetén.....	76
7. Az eredmények értékelése	78
8. Összefoglalás	86
9. Summary	89
10. Irodalomjegyzék	92
11. Publikációs lista	102
12. Köszönetnyilvánítás	104
13. Függelék	105

1. Rövidítések jegyzéke

A - nettó CO₂-asszimiláció vagy fotoszintetikus ráta

aa - aminosav

ABS - abszcizinsav

APX - aszkorbát-peroxidáz

AsA - aszkorbinsav

AsA-GSH ciklus - aszkorbát-glutation ciklus

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

bp - bázispár

cDNS – komplement-DNS

CIPK – calcineurin B-like-interacting protein kinase

CYP450 - citokróm P450 monooxygenáz

DHAR - dehidroaszkorbát-reduktáz

DHAsA - dehidroaszkorbát

E - transzspirációs ráta

EDTA – etiléndiamin-tetraecetsav

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

ER - endoplazmatikus retikulum

EST - expressed sequence tag

EXP - expanzin

FC - talaj-vízkapacitás

FT - friss tömeg

GO - génontológia

GR - glutation-reduktáz

g_s - sztómakonduktancia

GSH - glutation

GST - glutation-transzferáz

HI - harvest index

His - hisztidin

HRGP - hidroxiprolinban gazdag glükoprotein

Hsp - hősokkfehérje

JA - jázmonsav

LEA - late embryogenesis abundant

MDA - malondialdehyd
MDAR - monodehidroaszorbát-reduktáz
MDAsA - monodehidro-aszorbátgyök
mRNS – hírvivő RNS
NPQ - nem fotokémiai kioltás
nsLTP - nem specifikus lipidtranszfer-protein
nt - nukleotid
P5CS – Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-szintáz
PK – protein-kináz
PP – protein-foszfátáz
Pro - prolin
RT-qPCR – valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripció polimeráz-láncreakció
RWC - relatív víztartalom
SD - standard deviáció
SDS – nátrium-dodecil-szulfát
SOD - szuperoxid-dizmutáz
SSC – sodium saline citrate
SZT - száraz tömeg
TA - transcript assembly
Ta - *Triticum aestivum* L.
TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances
TBS - Tris buffered saline
TC - tentative consensus
TF - transzkripció faktor
WUE - vízhasznosítási hatékonyság
XET - xiloglükán-endotranszglükóziláz

2. Bevezetés

Az aszály mint környezeti hatás egyre inkább középpontba kerül a gyakran emlegetett globális felmelegedés, illetve az élelmezési gondok szempontjából. Hatalmas területeken termesztünk haszonnövényeket, búzát, rizst, kukoricát, stb., amelyek hozamát erőteljesen befolyásolja a szárazság, illetve annak mértéke és időtartama.

Munkánk során a búzát mint az egyik legfontosabb élelemforrásunkat tanulmányoztuk, mégpedig abból a szempontból, hogy milyen válaszra bírja egy hosszabb távú, mérsékelt kiszáradási folyamat a vegetatív fejlődés fázisában. Ez a stresszhatás ugyanis már zavarja a növények fejlődését, akklimatizációs folyamatokat indít el, de nem okozza a teljes növény pusztulását. Több búzafajtát vizsgáltunk, amelyeket a nemesítők szárazságstresszre toleránsnak, illetve érzékenynek találtak, elsősorban a vízhiány esetén realizált hozamuk alapján. Tudjuk, hogy a hozam nagyban függ a vegetatív szakasz biomassza-termelésétől, amit erősen befolyásol a növények számára elérhető víz jelenléte, illetve hiánya. Kísérleteink során a bokrosodás időszakában redukáltuk a növények öntözését, amely elsősorban a föld feletti hajtásrész fejlődésének csökkenését okozta. Az így kezelt növényanyag képezte a további, molekuláris vizsgálataink alapját, melyek segítségével a genotípusok génexpressziós mintázatában történt, vízhiány okozta változásokra kívántunk fényt deríteni. Elsősorban a gyökerekben történő változásokat követtük nyomon cDNS-macroarray, illetve oligonukleotid-microarray technikákkal, valamint az oxidatív stressz elleni védekezésben szerepet játszó aszkorbát-glutation ciklus enzimeinek kifejeződését levelekben RT-qPCR alkalmazásával.

3. Irodalmi áttekintés

„A stressz eredetileg a szervezetnek az ingerekre adott, nem specifikus válaszát jelölő, orvosi szakkifejezés volt. Mai értelmében azonban jelentése nagyjából „folyamatos feszültség” vagy „tartós idegesség”, mely rendszerint egy vagy több állandó negatív ingerre adott tartós válaszreakció a szervezet részéről.” Így definiálja a stressz fogalmát a manapság egyre népszerűbb Wikipédia, az internetes „szabad enciklopédia”. Végigolvasva ezt a definíciót, azonnal észrevehető, hogy elsősorban az embereket érő stresszfolyamatról van szó, holott a többi élőlényt is számos ingerhatás (stresszor) éri. Többek között a növényeket is. Amíg a helyváltoztató életformát folytató állatok és az ember is, akár aktív mozgással is el tudják kerülni a stresszforrást, addig a helyhez kötött életmódot folytató növényeknek folyamatosan alkalmazkodniuk kell a környezeti változásokhoz. Az alkalmazkodás több szinten zajlik: a szervezet, a szervek, a szövetek, a sejtek, valamint a molekulák szintjén. Erről a jól összehangolt folyamatról növényfiziológusok, biokémikusok, molekuláris biológusok, genetikusok egyre átfogóbb, részleteiben feltárt képet alkotnak szerte a világon.

Mielőtt ismertetném vizsgálataink részleteit, szeretnék definiálni néhány, stresszel kapcsolatos fogalmat:

- **Stressztolerancia / stressztűrőképesség** – a növény állóképessége, mely által megküzd az őt érő, káros környezeti hatással;
- **Akklimatizáció** – az a folyamat, melynek során a növény stressztűrőképessége megnő a stressz hatására;
- **Adaptáció** – a növény generációk során kialakult, genetikailag kódolt ellenállóképessége.

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a növények stresszre adott reakcióit, ismernünk kell magát a stresszort. Levitt (1972) szerint két nagy csoportja ismert a növényeket érő stresszhatásoknak: biotikus és abiotikus. A biotikus stressz okozói közé különféle vírusok, baktériumok, gombák, férgek, rovarok, növényevő állatok tartoznak. Jelentőségük nem kevésbé fontos a mezőgazdaság, és azon belül a termés hozam minőségének és mennyiségének szempontjából, de a jelen dolgozatban kevésbé tárgyalt mivoltukból adódóan a növények e fajta stresszre adott válaszait nem részletezem.

Az abiotikus stresszorok környezeti hatások (1. ábra), melyek típustól, intenzitástól és időtartamtól függően rendkívül diverz válaszreakciókra kényszerítik a növényeket. Az

egyes hatások ritkán jelentkeznek külön-külön, általában komplex hatást gyakorolnak a növényekre, pl. nyáron, szikrázó napsütésben, egy időben jelen van az erős fényhatás, a magas hőmérséklet és esetenként a vízhiány is.



1. ábra. Az abiotikus stresszorok csoportosítása Levitt szerint.

A hőmérséklet szempontjából mind a hideg, mind a meleg károsan hathat a növényekre. Az alacsony hőmérsékleten belül megkülönböztetünk fagyáspont feletti és alatti klímaviszonyokat. Amíg a 0°C feletti hideg a membránok fluiditását csökkenti, addig az ennél hidegebbek - a jégkristályok képződéséből adódóan - már mechanikailag károsítják a sejtek membránjait. A „forróság” szintén befolyásolja a membránok fizikai tulajdonságait, valamint hatására denaturálódhatnak a fehérjék. A proteinek ugyanígy érzékenyek az vízhiányt okozó környezeti hatásokra is - dehidratáltságuk következtében aggregálódnak. Így a hideg, a fagyás, a szárazság, a sóstressz képes csökkenteni a sejtek víztartalmát. Levitt (1972) az árasztást mint vízzel kapcsolatos stresszort is ide sorolta be, de az inkább hipo-, illetve anoxiát okoz a gyökerekben. A sugárzáson alapuló, káros tényezők közvetlenül a növények föld feletti részét éri - a fotoszintézist, annak elemeit károsítják, és ezen keresztül az egész növény életműködését, fejlődését befolyásolják. A kémiai ágensekként feltüntetett nehézfémek (pl. Cd, Cu, Ni), illetve növényvédőszerek a növények többségében mérgezési tüneteket okoznak - anyagcseréjük gátlódik, a fotoszintézis hatékonysága és ennek következtében növekedésük mértéke csökken, leveleik klorotikusak, nekrotikusak lesznek.

A környezeti hatások közül a szárazság az, amely leginkább sújtja a mezőgazdaságot, csökkentve a terméshozamot, ezért a dolgozatomban további részében részletesen a szárazságstresszel mint a globális felmelegedés egyik mezőgazdasági szempontból fontos következményével foglalkozom, azon belül is a vízhiány növényekre

gyakorolt hatásáról, a szárazság érzékeléséről és a kapcsolódó jelátviteli folyamatokról, az aszálystressz hatására indukálódó génekről, valamint az élettani változásokról lesz szó bővebben.

3.1. *„Ám eső nem esett többé, aszály dívott mindörökké.”*

(Szuhanics Albert: Az esőcsináló)

Mi történik, ha az eső nem esik többé? A talaj fokozatosan kiszárad – a felszínről indulva az egyre mélyebb rétegek felé. Ennek időbeli lefolyása erősen függ a talaj szerkezetétől, és ezen keresztül a talaj vízmegtartó képességétől. Agyagos talajok több vizet képesek megtartani mikrométeres szemcsenagyságukból adódóan, míg a nagyságrendekkel nagyobb szemcseméretű homokos talajok kevesebbet. Ennek hátterében a vizet adszorbeáló felület nagysága áll, mely fordítottan arányos a talajrészecskék átmérőjével. A kiszáradás következtében fokozatosan csökken a talaj vízpotenciálja, amelynek érzékelésével a növények különféle védekezési stratégiákat indítanak be létük fenntartásáért. Levitt (1972) háromféle akklimatizációs stratégiát különböztet meg:

1. „Escape” – a menekülő stratégia; az ezt követő növények termést hoznak és befejezik életciklusukat a kedvezőtlen körülmények bekövetkezése előtt;
2. „Avoidance” – a vízháztartás egyensúlyának fenntartásán, a káros hatások késleltetésén alapuló megelőző stratégia;
3. „Tolerance” – a stresszhatás következtében kialakuló változások tolerálásán alapuló stratégia.

A fenti csoportosítás inkább elméleti jellegű, mivel a növények többnyire e stratégiák kombinációit alkalmazzák. A továbbiakban lássuk, hogyan valósul meg mindez a részleteiben?

3.2. *A vízhiány érzékelése*

A talaj víztartalmának csökkenését a gyökerek érzékelik először, és innen továbbtődik a jel a hajtás irányába. A gyökér sejtjeinek ozmoszenzorai kétkomponenses rendszerek (Urao és mtsai 1999), amit már leírtak a baktériumok (Mizuno 1998) és az élesztőgombák (Ota és Varshavsky 1993) esetében is. A növényekben ennek a rendszernek a többlépéses változata valósul meg, amely áll egy szenzorból, egy intermedier foszfortranszfer fehérjéből és egy válaszregulátorból. Egy, már ismert szenzor a

plazmamembránban lokalizált hibrid hisztidin-kináz (*Arabidopsis*ban AHK1/AtHK1), amely a jelérzékelés által autofoszforilációt indukál, vagyis egy foszfátcsoport a konzervált hisztidinre kerül, onnan pedig egy konzervált aszparaginsavra, amely szintén a szenzoron található. Ezután a foszfátcsoport továbbítódik egy foszfortranszmitter fehérjére (*Arabidopsis*ban AHP), amely foszforilálja a válaszregulátort. Ez utóbbi a továbbiakban közvetlenül szabályozza a környezeti hatásra adott válaszreakciót. Az AHK1/AtHK1 ozmoszenzor mivoltát az is alátámasztja, hogy többnyire a gyökérben fordul elő, valamint mRNS-ének szintje az ozmotikus változások által regulált (Urao és mtsai 1999). Wohlbach és mtsai (2008) mindezt *athk1* nullmutánsokon és az *AHK1/AtHK1* gént túltermelő növényeken vizsgálták, amelyből az az eredmény jött ki, hogy a nullmutánsok kevésbé tűrik a vízhiányt, míg a gént túltermelő egyedek több toleranciát mutattak különböző szárazságstressz típusokkal szemben. Vizsgálataik során arra is fény derült, hogy az utóbbiakban megnőtt mind az abszcizinsav (ABS) koncentrációja, mind az e hormon bioszintézisében szerepet játszó gének transzkriptszintje. Tehát összefüggést mutattak ki az ozmoszenzor AHK1/AtHK1 és az ABS bioszintézise között.

3.3. Az abszcizinsav

3.3.1. Az ABS jellemzői és szerepe

A hajtás számára a hidrosztatikai nyomás mint fizikai információ mellett az ABS, a stresszhormon jelenti a fő kémiai információt a talaj víztartalmának állapotáról (Schachtman és Goodger 2008). A gyökérben szintetizálódó és a föld feletti részekbe transzportálódó ABS révén a levelek közvetve és gyorsan értesülnek a talaj kiszáradásáról, amelynek következtében bezáródnak a sztómák, lecsökken a transzspiráció, vagyis korlátozódik a további vízvesztés. Ezzel párhuzamosan egyéb, élettani változások - mint az ABS-koncentráció megemelkedésének folyamánai – is bekövetkeznek:

- indukálódik a gyökérnövekedés,
- fokozódik a gyökérszövetek vízfelvétele,
- megnő a gyökér hidraulikus konduktivitása és az ionfelvétel,
- serkentődik az oldalgyökerek képződése,
- és gátlódik a levélnövekedés.

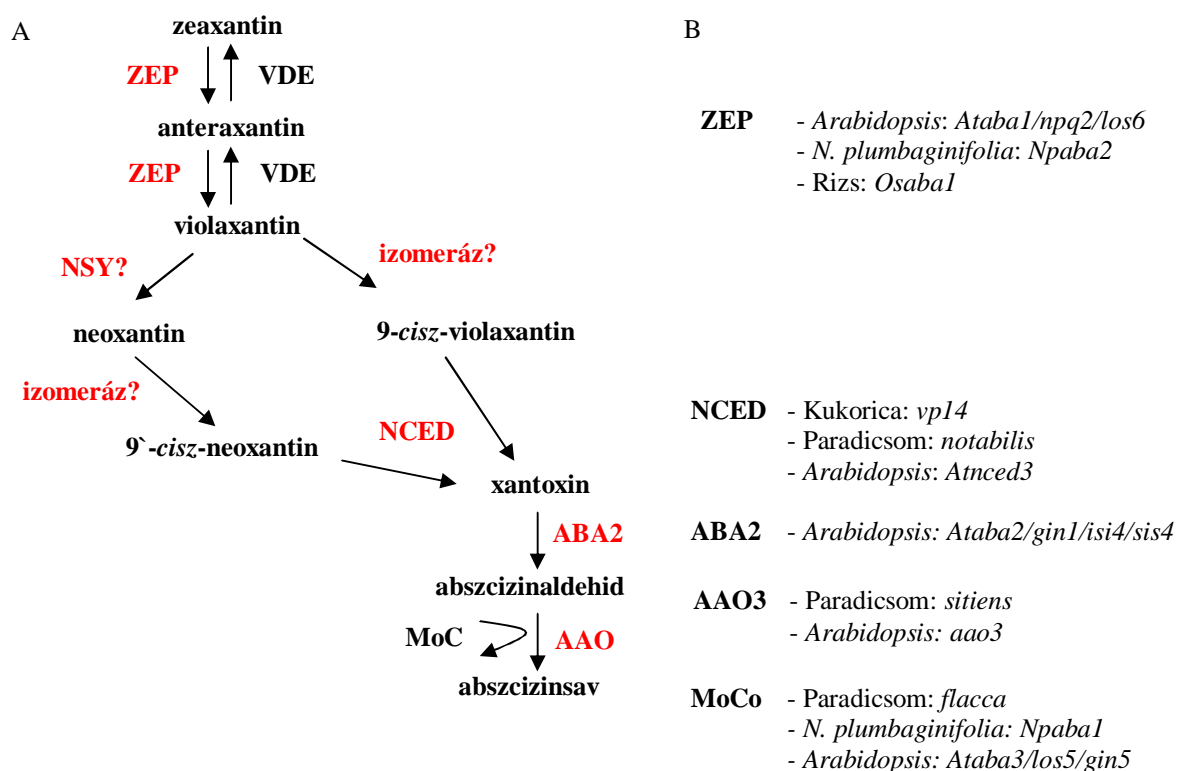
A fő ABS-forrás a gyökér, de a sztómazáródásban a levelekben szintetizált hormon is részt vesz (Holbrook és mtsai 2002). A gyökérből a levélig tartó jelátvitel a xilémén

keresztül zajlik, a folyamatnak egyik kulcstényezője a pH-változás. Több faj esetében írtak le szárazságstressz hatására lúgos irányba megváltozott xilémedv pH-értékeket, pl. *Helianthus annuus* (Gollan és mtsai 1992), *Phaseolus coccineus* (Hartung és mtsai 1998), *Commelina communis* (Wilkinson és Davies 1997) esetében. A xilémedv lúgosodása következtében az apoplaszt pH-ja is megnő. Az ABS – gyenge sav lévén – ilyen körülmények között deprotonált állapotban van, amelyből adódóan a mezofill sejtek passzív transzporttal nem tudják felvenni, így kumulálódik az apoplasztban. Az ABS akkumulációját a levelekben *de novo* szintetizált hormonszint is megnöveli, amely erősebb szárazságstressz esetén fokozódik. Ekkor a citoplazma savanyodásának következtében kerül át passzív transzporttal a protonált ABS a szimplasztból az apoplasztba. Mindezen folyamatok következményeként záródnak a sztómák. Ezen eredmények útján elindulva feltételezték, hogy az ABS receptora a plazmamembránban található. A közelmúltban három ABS-receptort fedeztek fel: egy sejtmembránban levőt és két intracellulárist. A gázcserenyílások záródásáért nagy valószínűséggel az a G-protein kapcsolt receptor tehető felelőssé, amelyről Liu és mtsai (2007) számoltak be. A két, sejten belüli receptor – a PYR/PYL/RCAR (Santiago és mtsai 2009) és a Mg-kelatáz H alegysége (Shen és mtsai 2006) – szerepe a hajtásban generálódó vízhiány esetén kerül előtérbe (Wilkinson és Davies 2002).

A xilém és az apoplaszt lúgos kémhatása a plazmamembrán H^+ -ATPázok alulműködéséből adódik, amely ABS jelátviteli úton keresztül szabályozódik szárazságstressz hatására. Merlot és mtsai (2007) ezt OST2 (OPEN STOMATA 2) mutánsok tanulmányozásával bizonyították be, amelyeknél e protonpumpák hiányoztak. Eredményeikből azt is megtudhatjuk, hogy e protonpumpák hiánya nagyban hozzájárul a membrán depolarizációjához, vagyis az ABS-indukálta anioncsatornák nem működő protonpumpák mellett tudják kellőképpen biztosítani a megfelelő elektrokémiai grádienszt a sztómák záródásához. Génexpressziós vizsgálatokban is kimutatták, hogy a vízhiány represszálja a H^+ -ATPáz gén kifejeződését pl. burgonyában (Kopka és mtsai 1997). Viszont egyes fajok, és egy fajon belül egyes genotípusok esetében a xilémedv, valamint az apoplaszt pH-jának emelkedése elmarad vagy kisebb mértékben valósul meg aszálystressz hatására, és ennek következtében a sztómák záródása is eltérő (Liu és mtsai 2003; Prokic és mtsai 2006).

3.3.2. Az ABS bioszintézise

Az ABS-koncentrációt kétféleképpen szabályozhatják a növények: a bioszintézis növelésével és/vagy a lebontás (inaktiválódás) csökkentésével. A szakirodalom elsősorban a hormon előállításának fokozását tárgyalja részletesen – a folyamatban részt vevő enzimek leírása jól kidolgozott (2. ábra). A zeaxantin-epoxidáz (ZEP) enzim katalizálja a zeaxantin → violaxantin reakciót egy köztes terméken, az anteraxantinon keresztül. Paradicsomban írták le Thompson és mtsai (2000), hogy vízhiány esetén elsősorban a gyökérben nő meg a ZEP mRNS-mennyisége, levélben viszont transzkripcszinten nem volt reakció a megváltozott, környezeti viszonyokra. Valószínűleg elegendő violaxantin található a paradicsom leveleiben. A bioszintézis limitáló lépését katalizáló enzim a 9-*cisz*-epoxikarotinoid-dioxigenáz (NCED), amely a 9-*cisz*-violaxantin, illetve a 9'-*cisz*-neoxantin hasítását végzi, a reakció terméke pedig a xantoxin.



2. ábra. Az ABS bioszintézise (A) és a defektív mutánsok listája (B). ZEP – zeaxantin-epoxidáz, VDE – violaxantin-deepoxidáz, NSY – neoxantin-szintáz, NCED – 9-*cisz*-epoxikarotinoid-dioxigenáz, ABA2 – rövidláncú alkohol-dehidrogenáz, AAO3 – abszcizinaldehyd-oxidáz, MoCo – molibdén kofaktor (Nambara és Marion-Poll (2005) szerint).

Számos növényfajban írták le, hogy a NCED-t kódoló gén kifejeződése megnő vízhiány esetén (kukorica – Tan és mtsai 1997; paradicsom – Burbidge és mtsai 1997; *Arabidopsis* – Neill és mtsai 1998; bab – Qin és Zeevaart 1999; tehénborsó – Iuchi és mtsai 2000). Iuchi és mtsai (2000), valamint Thompson és mtsai (2000) is kimutatták, hogy ABS-kezelésre tehénborsóban és paradicsomban nem növekszik a gén mRNS-szintje, tehát nagy valószínűséggel nincs pozitív visszacsatolás a szintetizált hormon és a NCED gén indukciója között, viszont földimogyoróban létezik ez a jelenség (Wan és Li 2006). Kulcsenzim mivolta, valamint a stressz általi indukálhatósága késztetett számos kutatócsoportot arra, hogy a gén túltermeltetésével feljavítsák adott fajok szárazságtoleranciáját (pl. Iuchi és mtsai 2001; Thompson és mtsai 2007). Tung és mtsai (2008) arra a következtetésre jutottak, hogy a magas ABS-tartalmú, transzgénikus növények hatékonyabb vízhasznosítással rendelkeznek (magasabb WUE), viszont egyéb, fenotípusos tulajdonságukra negatívan hatott a magas hormonszint. Tehát a mezőgazdaság szempontjából mindenféleképpen egy mérsékelt ABS-szintemelés lenne célszerű. A bioszintézis utolsó lépését az abszeizinaldehid-oxidáz (AAO) katalizálja. Seo és mtsai (2000) *Arabidopsis*-ban tanulmányozták az enzim négy génjét - *AAO1-4* -, amelynek eredményeként azt kapták, hogy az *AAO3* elsősorban a rozettalevelekben fordul elő, és mRNS-szintje megnőtt szárazságstressz hatására, holott a fehérjeszint nem változott. Az *AAO4* transzkriptszintje ugyanígy emelkedett, az *AAO1*-é állandó maradt, az *AAO2*-é pedig csökkent.

3.4. A szárazságstresszhez kapcsolódó jelátvitel

Ahogy korábban már említettem, az ABS-nek mind a plazmamembránban, mind pedig a sejten belül található receptora. A ligand (ABS) receptorokhoz való kötődésével beindul a jelátviteli folyamat, melynek végeredményeként vagy génexpresszió vagy -szuppresszió jelentkezik. A hálózatnak számos eleme van – kinázok, foszfatázok, transzkripciós faktorok, DNS *cis*-elemek. A kinázok között találunk Ca^{2+} -útvonaltól függetlent (SnRK2) és Ca^{2+} által szabályozottat is (CIPK és CDPK). Az SnRK2 kinázok pozitív regulátorai az ABS jelátvitelnek, míg a CIPK enzimekre inkább a negatív szabályozás jellemző. Ellentétben más, Ca^{2+} által aktivált CDPK-kal, amelyek szintén pozitívan hatnak az ABS-függő utakra. A foszfatázok közül kiemelendő a PP2C enzimszerepe a másik kettővel – PP1 és PP2A – szemben. A PP2C enzimek szerin/treonin foszfatázok, *Arabidopsis*-ban tíz csoportjukat írták le (Schweighofer és mtsai 2004), melyek

közül az A csoport tagjait ismeri a szakirodalom úgy, mint az ABS-jelátvitel fő negatív szabályozói. Egyik célfehérjénk az SnRK2 enzim, melynek inaktiválásával szabályozzák több, ABS-regulált gén kifejeződését. A PP2C-k funkciója ABS-gátolt, a hormon intracelluláris PYR/PYL/RCAR receptorához kötődve oldja a foszfatázok negatív hatását (Santiago és mtsai 2009). Ez a visszacsatolás szükséges az ABS-hatás, pl. növekedés, finom szabályozására. A stresszhormon génkifejeződést szabályozó hatását közvetlenül a transzkripciós faktorok és a DNS-en található *cis*-elemek határozzák meg. Szárazságstressz során az ABS-jelátvitelben ismert transzkripciós faktorok a MYB- és MYC-fehérjék, az ABRE (ABA Response Elements) DNS-doménhez kötődő bZIP (basic leucine zipper)-fehérjék, valamint a DRE (Drought Response Elements)-elemhez kapcsolódó DREB1D (DRE-binding)/CBF4 (C-Repeat Binding Factor) proteinek. Számuk több tucat családonként, tehát az egyedi gének kifejeződésében játszott szerepük beható vizsgálatokat igényel. Egyéb transzkripciós faktorok is szerepelhetnek az ABS-indukálta génkifejeződés szabályozásában, pl. HD-ZIP (homeodomain-leucine zipper), WRKY (Trp-Arg-Lys-Tyr peptidmotívummal jellemzett transzkripciós faktor), bHLH (non-MYC basic helix-loop-helix) és Zn-ujj fehérjék.

3.5. ABS által szabályozott gének és szerepük a stresszválaszban

A továbbiakban azon fehérjéről lesz szó, melyek transzkriptszintje az ABS által szabályozódik a fent említett ABS-bioszintézis kulcsenzimein, valamint a jelátvitelben szereplő molekulákon kívül.

3.5.1. Ozmotikumok szintézisének enzime

A szárazságstressz lassú, folyamatos kialakulásakor a növények ozmotikumok szintézisével is segítik a sejtek turgorának fenntartását, valamint a vízfelvétel folytonosságát. Ilyen ozmotikumok lehetnek aminosavak (pl. prolin), cukrok (pl. trehalóz), cukoralkoholok (pl. mannitol, szorbitol), kvaterner ammóniumvegyületek (pl. glicin-betain), amelyek általában a citoplazmában halmozódnak fel (Chen és Murata 2002). Az ozmotikus potenciál beállításán kívül egyéb szerepük is lehet, pl. a reaktív oxigénszármazékok kioltása, a fehérjék és a sejtstruktúra stabilizálása. Bioszintézisük kulcsenzimeinek mRNS-szintje megnő aszálystressz során, ezáltal fokozódik előállításuk, és azon keresztül az ozmotikus helyreállítás. Ilyen enzimek, pl. prolin esetében a

Δ^1 -pirrolin-5-karboxilát-szintáz, glicin-betain esetében a betainaldehid-dehidrogenáz, cukrok esetében pl. a trehalóz-6-foszfát-szintáz, valamint cukoralkoholok esetében pl. a mannitol-1-foszfát-dehidrogenáz és a szorbitol-6-foszfát-dehidrogenáz. Számos fajból állítottak elő olyan transzgénikus növényeket, amelyekben a fenti enzimek génjeinek valamelyikét fejeztették ki magas szinten, hogy megnöveljék az adott egyedek stressztűrőképességét (pl. Zhu és mtsai 1998; Jang és mtsai 2003). Ezeknek a próbálkozásoknak a többsége eredményes volt, és ezáltal - legalábbis laboratóriumi körülmények kötött - sikerült nagyobb stressztűrőképességű növényeket létrehozni.

3.5.2. Védőfunkciót ellátó fehérjék - LEA fehérjék, molekuláris chaperonok

3.5.2.1. LEA fehérjék

Mind a sejtek membránjai, mind a makromolekulák rosszul tűrik a vízvesztés állapotát. Védelmükre számos proteint halmoz fel a sejt, amelyek hidrofíl mivoltukból eredően fenntartják számukra az optimális környezeti feltételeket. Ilyen „sejtalkotók” a LEA (late embryogenesis abundant) fehérjék, amelyek ionokat kötő és nagy vízmegtartó képességükből adódóan képesek megőrizni a sejtkomponensek dehidráció alatti integritását. Hét csoportjukat különböztetik meg (Battaglia és mtsai 2008):

1. csoport (D-19) - pl. Em fehérje búzában (*Triticum aestivum* L.); szárazság esetén akkumulálódik, és enzimek aggregációját akadályozza meg.

2. csoport (D-11) - dehidrinek; 5 alcsoportjuk van a különböző szekvencia-motívumok alapján; ebből kiindulva több funkciójuk ismert: makromolekula-védelem, fémmérgezés elleni védelem (fémionok megkötése) (Hara és mtsai 2005), gyökfogóképesség (Hara és mtsai 2004), krioprotektív aktivitás (Reyes és mtsai 2005), chaperonszerű viselkedés (Ca^{2+} -függő) (Alsheikh és mtsai 2003), abiotikus stressz (alacsony hőmérséklet, ozmotikus és sóstressz) elleni védelem (stressztolerancia) (Puhakainen és mtsai 2004; Brini és mtsai 2007).

3. csoport (D-7/D-29) - pl. HVA1 árpaiban (*Hordeum vulgare* L.); két alcsoportjuk van a 11 aminosavból álló szekvencia-motívum nagy variálhatósága alapján (3A és 3B). Legfontosabb funkciójuk a környezeti stressz (hideg, fagy, aszály, magas sótartalom) hatására bekövetkező akklimatizáció egy szoros, H-kötésekkel megszilárdított hálózat létrehozásával, gyökérnövekedés fenntartása vízhiány esetén (Ried és Walker-Simmons 1993).

4. csoport (D-113) - két alcsoportjuk van a szekvencia-motívumok és hosszúságuk alapján (4A és 4B); szárazság- és sóstressz során a hajtásmerisztémában, a fejlődő és érett magvakban akkumulálódnak, és védőfunkciót látnak el.

5. csoport - atípusos vagy hidrofób LEA fehérjék; három alcsoportjuk van a szekvencia-azonosságuk alapján (5A, 5B és 5C); transzkriptszintjük megnő a magfejlődés utolsó szakaszában, valamint különböző stresszorok hatására (szárazság, UV-fény, szalinitás, hideg és sebzés).

6. csoport (PVLEA18) - kisméretű fehérjék; nagymértékben akkumulálódnak száraz magvakban és pollenszemekben, továbbá vízhiány során; a többi hidrofíl LEA fehérjétől eltérően nem tudják megakadályozni az enzimek inaktiválódását, talán az eltérő célfehérjékből adódóan (Reyes és mtsai 2005).

7. csoport (ASR1) - kifejeződésük fajfüggő; egyes fajokban akkumulálódnak öregedés során, gyümölcs-, mag-, illetve pollenéréskor, továbbá abiotikus stresszhatások során (aszály, szalinitás, hideg és korlátozott fényviszonyok). Túlermelletésük szárazság-, valamint sóstressz-toleranciát eredményez (Yang és mtsai 2005).

3.5.2.2. Molekuláris chaperonok - hősokkfehérjék (Hsp)

Szárazságstressz hatására megváltozik a növényi sejt fehérje-összetétele - mind minőségileg, mind mennyiségileg. Az újonnan szintetizált fehérjéknél az aminosavsorrend mellett fontos a másod-, illetve harmadlagos struktúra is. Ebben játszanak fontos szerepet a „hajtogató”, azaz a hősokkfehérjék, amelyek ezen túl megakadályozzák a proteinek aggregációját, szállításukat végzik az egyes sejtkompartmentekbe, valamint a „hibás” fehérjék eliminálásában is részt vesznek. Kifejeződésük általában a stresszhatás jelenlétéhez kötött, felhalmozódásukat a stressztoleranciához kapcsolják (Bartels és Sunkar 2005). A molekulatömegük alapján öt nagy csoportba sorolják őket (Wang és mtsai 2004):

1. Kis Hsp-k (sHsp) - molekulatömegük 12 és 40 kDa közé esik. Hat alcsoportjukat különböztetik meg, amelyek eltérő tömegűek, valamint más-más kompartmentben fordulnak elő. Funkciójuk a fehérjék aggregációjának megelőzése, a nem natív proteinek stabilizációja. Különböző abiotikus stresszorok, úgymint alacsony és magas hőmérséklet, szárazság, só-, illetve oxidatív stressz hatására indukálódnak. Akkumulációjuk mértéke összefügg az adott növény stressztoleranciájával.

2. Hsp60 (chaperonin) - Két alcsoportjuk van: I. alcsoport a kloroplasztisban és a mitokondriumban (Cpn60), a II. alcsoport pedig a citoplazmában (CCT) található.

Hajtogató, valamint az újrachajtogatásnál asszisztáló szerepet töltenek be az újonnan szintetizált, illetve transzportált fehérjék natív formájának kialakításában.

3. Hsp70 - Két alcsoportjuk van: DnaK (Hsp/Hsc70 a citoplazmában, Hsp70 a kloroplasztiszbán és a mitokondriumban, Bip az ER-ban) és Hsp110/SSE (Hsp91 a citoszolban). Funkciójuk: a fehérjék aggregációjának megelőzése, segédkezés a proteinek újrachajtogatásánál (mind normál, mind stresszkörülmények között), prekursor fehérjék importálása és áthelyezése, nem stabil proteinek proteolitikus lebontásának elősegítése (a lizo-, illetve proteaszómákba való irányítás), jelátvitel (egyes kinázok, illetve foszfatazok modulációja) és transzkripció aktiválása („hajtogatott” szabályozó fehérjék ellenőrzése - pl. hő sokkfaktorok által mediált kifejeződés negatív repressziója). Expressziójuk megnő magas és alacsony hőmérsékleten, aszálykor és kémiai stresszorok jelenlétében.

4. Hsp90 - megtalálható a citoplazmában, a mitokondriumban, a kloroplasztiszbán és az ER-ban. Szerepe: jelmolekulák (kinázok, szteroidhormon-receptorok) érésének elősegítése, sejtciklus ellenőrzése, fehérjedegradáció, proteinszállítás és olyan mutálódott fehérjék „életben tartása”, amelyek fejlődést és morfológiát kontrollálnak („genetic buffering”, de csak stresszkörülmények között). Optimális feltételek mellett is megtalálható a sejtekben (egy sejt összfehérjéinek az 1-2%-át teszi ki), de stresszorok (magas/alacsony hőmérséklet, szalinitás, nehézfémek, növényi hormonok, fény/sötétség átmenet) hatására többszörösére fokozódik mRNS-ének mennyisége.

5. Hsp100 (Clp) - az AAA ATPáz szupercsalád tagjai. Két alcsoportjuk van: az I. alcsoport tagjai a citoplazmában és a mitokondriumban találhatók (ClpB, A/C, D), a II. alcsoporté pedig a kloroplasztiszbán (ClpM, N, X, Y). Funkciójuk a fehérjeaggregátumok szétszedése, valamint a proteinek széthajtogatása - a nem funkcionális, káros fehérjék eliminálása. Normál körülmények között is jelen vannak a sejtekben. Kifejeződésük fejlődési állapot által szabályozott, valamint megnő különböző környezeti faktorok jelenlétében (magas és alacsony hőmérséklet, aszály, sóstressz).

3.5.3. A növényi sejt membránjainak hidraulikus konduktivitását növelő transzportfehérjék

A vízfelvétel és a sejtmembránokon át folyó víztranszport egyaránt fontos kedvező és kedvezőtlen körülmények között. A növényi sejtekben az aquaporinok látják el ezt a feladatot, fenntartva ezáltal az egész növény hidratált (turgor) és tápanyaggal ellátott állapotát (Maurel és mtsai 2009). Külön kiemelendő a vakuólum, illetve az ezen

organelumot körülhatároló membrán, a tonoplaszt szerepe a turgor, és ezen keresztül a megfelelő vízpotenciál kialakításában. Vízhány esetén a plazmamembrán és a tonoplaszt összehangolt víztranszportja szükséges a vízvesztés elkerülése érdekében. Vizsgálatok kimutatták, hogy a tonoplaszt vízáteresztő képessége, valamint aquaporin-aktivitása sokkalta nagyobb, mint a plazmamembráné (pl. Niemietz és Tyerman 1997), de ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a tonoplaszt összfehérjéjéhez képest e proteinek fordulnak elő a legnagyobb arányban (Maeshima 2001). A szabályozásukat tekintve elmondható, hogy a környezeti hatásra adott gyorsválasz során az aktivitás-, illetve a mennyiségbeli változás dominál. Az aktivitás szabályozásában elsősorban a foszforiláció/defoszforiláció folyamata játszik szerepet - foszforiláltan nyitottak a pórusok, a foszfát csoportok hasításával pedig záródnak. Továbbá leírták, hogy a hidrogén-peroxid (H_2O_2) - mint jelmolekula - az aquaporinok internalizációját serkenti, melynek következménye a lecsökkent víztranszport (Boursiac és mtsai 2008). A hosszabb távú stresszhatás már transzkripciós szinten befolyásolja az egyes izoformák kifejeződését. Ez jelenthet mind felül-, mind alulszabályozást (Hachez és mtsai 2006), ami nagyban függ a fajtól, fajtától, a stressz formájától, a növényi szervtől és az adott izoforma minőségétől (pl. Lian és mtsai 2004; Alexandersson és mtsai 2005). Az aquaporinok négy nagy csoportját különböztetjük meg (Kaldenhoff és Fischer 2006):

1. Plazmamembránon belüli fehérjék (plasma membrane intrinsic protein - PIP) - PIP1 (PIP1;1-1;5) és PIP2 (PIP2;1-2;8) alcsoport. A PIP2 fehérjék kifejeződésének növekedésével jelentősebben emelkedik a plazmamembrán vízáteresztő képessége, a PIP1-re ez nem jellemző (Chaumont és mtsai 2000), de együttes kifejeződésük megemeli ez utóbbi víztranszportját is. A PIP1 transzportja és beépülése a membránba egyébként nagyban függ a PIP2 kifejeződésétől (Zelazny és mtsai 2007). A PIP1 alcsoport fehérjéi továbbá képesek egyéb molekulák szállítására is, úgymint glicerol, bórsav, urea és CO_2 (Alexandersson és mtsai 2005). Ez utóbbi szállításából adódóan az aquaporinoknak nagy szerepük van a mezofill-konduktancia (g_m) felerősítésében, ami elsősorban a stresszhatások következtében „legyengült” fotoszintézis hatékonyságán javít (Uehlein és mtsai 2003). A PIP2 fehérjék között is találtak más szubsztrátot szállítót, pl. az AtPIP2;1 képes a H_2O_2 transzportjára, amely folyamat - a H_2O_2 „küldönc” funkcióját tekintve - fontos szerepet játszik a sejtek közötti kommunikációban (Dynowski és mtsai 2008).

2. Tonoplaszton belüli fehérjék (tonoplast intrinsic protein - TIP) - a sejten belüli víztranszport kulcsfigurái, öt alcsoportjuk van (TIP1-5). Fejlődési állapottól, illetve

szervtől függően történik az egyes izoformák eloszlása - más-más, specifikus funkciókat látnak el (Jauh és mtsai 1998).

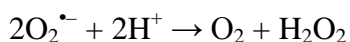
3. NOD26-hoz hasonló proteinek (NOD26-like intrinsic proteins - NIP) - megtalálhatók mind a plazma-, mind az intracelluláris membránban, valamint két alcsoportjuk: NIP1 és NIP2 ismert. A vízáteresztő képességük alacsony, inkább pl. a glicerolt, az ureát részesítik előnyben (Maurel 2007). A sejten belüli mennyiségük általában kisebb, mint az előző két csoport tagjaié, de ez nem von le semmit a jelentőségükből. Egyik fontos szerepük a bórsav felvételében van - amelynek egyik következménye a megfelelő gyökérnövekedés (sejtfal-megnyúlás) (Takano és mtsai 2006).

4. Kis, bázisos fehérjék (small basic intrinsic protein - SIP) - az ER membránjában találhatók, két alcsoportjuk van: SIP1 (SIP1;1-1;2) és SIP2 (SIP2;1-2;2). Eddigi adatok alapján a vizet nem képesek áteresztetni, tehát valószínűleg más funkciót látnak el (Ishikawa és mtsai 2005).

3.5.4. Az oxidatív stressz kivédésében szerepet játszó proteinek

Többször megnevezem a kifejeződésük különböző környezeti stresszhatások során, melynek következményeként csökken a káros reaktív oxigénszármazékok (ROS) mennyisége. Ezáltal a növény megóvják makromolekuláinak, sejtjeinek épségét az oxidatív stressz ellen. Ide tartozik a szuperoxid-dizmutáz, a kataláz, a glutation-transzferáz és a különböző peroxidázok.

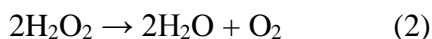
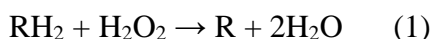
1. Szuperoxid-dizmutáz (SOD) - a szuperoxid-gyökanion eliminálását végzi a következő reakció alapján:



A SOD-ok metalloproteinek, melyek a kötött fémion minősége alapján lehetnek:

- Cu/ZnSOD - a kloroplasztisban és a citoszólban fordul elő,
- MnSOD - a mitokondriumban található,
- FeSOD - néhány növényfaj kloroplasztisában fordul elő,
- NiSOD - csak a prokariótákban lelhető fel.

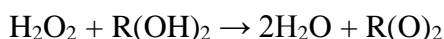
2. Kataláz (CAT) - a H_2O_2 eliminálását végzi a következő reakciók valamelyike alapján:



A H_2O_2 koncentrációjától függ, hogy melyik folyamat megy végbe. Alacsony $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ($<1\mu\text{M}$) mellett a (1) dominál, mely által számos hidrogéndonor (pl. etanol, aszkorbinsav) oxidálódik. Az ennél magasabb (toxikus) koncentráció esetében már a (2) reakció kerül előtérbe, mely folyamat egyik nagy előnye, hogy nem fogyaszt egyéb redukáló ágenszt (Scandalios 2005).

3. Glutation-transzferáz (GST) - a glutation (GSH) konjugálásával detoxifikálnak citotoxikus endogén, illetve xenobiotikus vegyületeket. Ezen kívül részt vesznek még különböző hormonok, úgymint auxin, citokininek és etilén szállításában, valamint - glutation-peroxidáz aktivitásuk révén - lipidperoxidációs termékek redukálásában. Egy nagy enzimsaládról van szó, mely hét alcsoportból tevődik össze: phi (GSTF), tau (GSTU), theta (GSTT), zeta (GSTZ), lambda (GSTL), dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR) és a tetraklorohidrokinon-dehalogenáz (GSTTCHQD). A phi és a tau csoport növény-specifikus, és a GST-k zöme ezen enzimek közül kerül ki - többnyire ezek végzik a GST-konjugációt. A theta és a zeta GST-k az állatokban is megtalálhatók, és szekvenciaszinten konzerváltságot mutatnak a növényi megfelelőikkel. A GSTT-k rendelkeznek GPOX-, a GSTZ-k pedig GSH-függő izomeráz-aktivitással. Ez utóbbi a maleil-acetoacetát fumaril-acetoacetáttá való átalakítást jelenti, mely a tirozin-degradáció egyik lépése. A DHAR és GSTL kissé elüt a többi csoporttól - inkább monomer, mint dimer formában fordulnak elő. Mindkét csoport rendelkezik tioltranszferáz-aktivitással, a DHAR-ok pedig - amint a későbbiekben látni fogjuk (3.8. alfejezet) - a dehidroaszkorbát aszkorbinsavvá való redukcióját is katalizálják (Edwards és Dixon 2005).

4. Peroxidázok (Px) - szintén a H_2O_2 detoxifikálását végzik a következő reakciót követve:



A redukáló ágens alapján többféle peroxidázt különböztetünk meg, pl.:

- aszkorbinsav - aszkorbát-peroxidáz (APX) - részleteiben ld. a 3.8. alfejezetben.
- glutation - glutation-peroxidáz (GPOX) - a H_2O_2 -on kívül alkil-hidroperoxidokat is redukálnak alkohollá. Néhány GST is rendelkezik ilyen aktivitással, pl. GSTT.

3.5.5. *A proteinbontásban részt vevő enzimek - proteázok*

A proteázok fehérjebontó tulajdonságuk révén szabályozó szerepet is betöltenek a növényi sejt életében - az általuk lebontott protein sorsa visszafordíthatatlan. Ezáltal különböző fejlődési és környezeti behatásokra adott válaszokat irányítanak. Mivel minden egyes proteáz szubsztrátspecifikus, ezért működésük erősen szabályozott mind térben, mind időben. Számos biológiai folyamatban vesznek részt - többek között a meiózisban, embriogenezisben, a sztómák kifejlődésében, a kloroplasztisz-biogenezisben, valamint helyi és szisztémás védekezési reakciókban (van der Hoorn 2008). Négy nagy csoportjukat különböztetjük meg: cisztein-, szerin-, metallo- és aszpartát-proteázok. A szakirodalom többnyire a cisztein-proteázok indukcióját említi aszály-, valamint sóstressz során (pl. Harrak és mtsai 2001).

3.6. *Az ABS-független utak jelentősége a stresszválaszban*

Az előző fejezetekben azokat a jelátviteli folyamatokat taglaltuk, amelyeknek a fő közvetítő eleme az ABS mint stresszhormon. Ezen kívül viszont vannak olyan, szárazságstresszhez kapcsolt, génkifejeződést szabályozó jelátviteli utak is, amelyek ettől a hormontól függetlenek. Az ozmotikus behatásokra, mint a szárazság és a sóstressz, a növények az ABS-függő utat részesítik előnyben, míg a hideg inkább az ABS-től függetlenül aktiválja, illetve represszálja a válaszgének átírását. Vannak olyan célgének, amelyek kifejeződését mindkét útvonal befolyásolja, ilyenek pl. a COR (cold responsive) gének (pl. *RD29A*) (Ishitani és mtsai 1997). Az ABS-független kaszkád fontos elemei az AP2-típusú transzkripciós faktorok, a DREB2A és DREB2B, amelyek a DRE *cisz*-elemhez kapcsolódva szabályozzák a stresszválaszgének kifejeződését.

Az ABS-en kívül más növényi hormonok is részt vesznek az abiotikus stresszre adott válasz szabályozásában, akár közvetlen, akár közvetett módon, úgymint a szalicilsav (SA), a jázmonsav (JA) és az etilén (ET). Mindezt az ABS-sel együttműködve teszik elég komplex módon, pl. az AtMYC2 és az ERF1 transzkripciós faktorok kapcsolódó pontjai a JA/ABS, illetve a JA/ET jelátviteli utaknak (Lorenzo és Solano 2005). Ezen interakciók valószínűleg az egyes stresszorok által kiváltott válaszok összehangolását szolgálják, valamint megfelelő egyensúlyt biztosítanak a különböző válaszreakciók között a sejt, illetve a növényi szervezet szintjén (Hirayama és Shinozaki 2010).

3.7. Fotoszintézis aszályos körülmények között

A növények elsőszámú szerepe a földi bioszférában, hogy szervesen anyagokból szerveset állítanak elő. A folyamat hajtóereje a Nap energiája, melynek kémiai energiává való konvertálásáért a fotoszintetikus pigmentek, azaz a klorofilok felelősek. Magasabbrendű növényekben a klorofill *a* és *b* fordul elő, egymáshoz viszonyított mennyiségük általában 3:1. Környezeti stresszhatások jelenlétekor mennyiségük csökkenhet (Li és mtsai 2006) vagy növekedhet (García-Valenzuela és mtsai 2005). A klorofilok mellett kísérő pigmentként karotinoidok is megtalálhatók a fotoszintetizáló szervezetekben. Két csoportjukat különböztetjük meg – vannak a karotinok és a xantofilok. Szerepük a fotoszintézisben elsősorban az elnyelt fényenergiának a klorofilok felé történő továbbításában van. Abiotikus stresszek esetén egyéb funkciójuk is előtérbe kerül - a nem fotokémia kioltás (NPQ) legfőbb komponensei, vagyis a fotooxidatív hatásoktól védik a fotoszintetikus apparátust.

A növények sztómazáródással reagálnak a csökkent vízellátottságra, hogy mérsékeljék a további vízvesztést. A sztómák – az evapotranszspiráció mellett – a gázcserének is elsődleges helyei, vagyis a fotoszintézis zavartalan működéséhez nélkülözhetetlenek. Amikor a sztómák záródásával a sztómakonduktancia (g_s), és vele együtt a transzspiráció (E) is lecsökken, akkor a fotoszintézishez szükséges CO_2 -transzport is leáll, vagyis a növény szervesanyag-előállítása háttérbe szorul. Az alacsony CO_2 -koncentráció tehető felelőssé a fotoszintézis tulajdonképpeni csökkenéséért, és nem a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz/oxigenáz (Rubisco) enzim aktivitásának csökkenése. Ez a fehérje ugyanis a szervesanyag-szintézis kulcsenzime – a CO_2 -fixáció alapreakcióját katalizálja. Mennyisége, aktivitása mérséklődik környezeti stresszhatások, pl. szárazság hatására, azon belül is a sztómák záródását követően. A stresszre adott válaszreakció e lépése faj-, illetve fajtafüggő (Flexas és mtsai 2006), a stressz mértékétől függően másképp reagál pl. a szója (*Glycine max* L.) és a dohány (*Nicotiana tabacum* L.). A szójánál gyors deszikkáció során az enzim csökkent aktiválhatóságát mérték, míg a fehérje összmenyisége és összaktivitása visszaesett folyamatos aszálystressz alkalmával. Ezzel szemben a dohánylevelekben nem következett be aktivitáscsökkenés e két stressz hatására.

Aszályos időkben – az eddigiek mellett - a fotoszintézis metabolizmusának szabályozásában fontos szerepet játszanak az oldható cukrok, azaz a szacharóz, a glükóz és a fruktóz. Ez úgy valósul meg, hogy a koncentrációjuk megnő a keményítő lebontásának következtében, ami befolyásolja egyes gének kifejeződését, valamint megváltozik a

fehérjemintázat. Magas cukortartalom esetén csökken a fotoszintézisben részt vevő enzimek transzkriptszintje, míg a szénhidrátok lebontásában szerepet játszó, továbbá a raktározott poliszacharidok, lipidek és fehérjék szintézisét katalizáló enzimek mRNS-mennyisége megnő (Stitt és mtsai 2007). Mérsékelt aszály során a fényreakciók, az elektrontranszport és a NADP^+ redukciója nem változik, ennek következtében felborul az energiaegyensúly, mivel hiányzik a CO_2 , ami átvenné az elektront (Lawlor és Tezara 2009). Átmeneti megoldást nyújthat a növények számára a fotorespiráció jelensége, vagyis a glikolát-ciklus, amelynek során a ribulóz-1,5-biszfoszfáthoz (RuBP) CO_2 helyett O_2 adódik, vagyis a Rubisco oxigenáz-aktivitása kerül előtérbe. A reakció két terméke a glikolsav-foszfát (PPG) és a glicerinsav-3-foszfát (G3P). A PPG a kiindulási pontja azon további folyamatoknak, melyeknek következménye a H_2O_2 keletkezése, az ATP-szintézis elmaradása, valamint a nettó szén- és nitrogénvesztés, vagyis a biomassa növekedésének visszaesése. Ez elsősorban a mezőgazdaság szempontjából fontos, mivel a termés hozam csökkenését eredményezi (Kimball 1983). Kebeish és mtsai (2007) találtak egy áthidaló megoldást *Arabidopsis*-ban, melynek segítségével fokozták a fotoszintézis hatékonyságát és a biomassa produkcióját. Módszerük lényege az *Escherichia coli* baktérium glikolát-katabolizmus enzimeinek bevitele volt *Arabidopsis* kloroplasztiszokba. Ezáltal a keletkezett glikolsavat közvetlenül glicerinsavvá alakították a növények.

A fotorespiráció - hátrányain túl - talán egyetlen előnye, hogy a kloroplasztisz NADPH_2 -jét oxidálja, vagyis lehetővé teszi, hogy a redukált ferredoxin- NADP^+ -oxidoreduktáz (FNR) megszabadulhasson két, felesleges elektrontól, átadva őket az oxidált NADP^+ -nak. Amint mondtuk, ez csak egy átmeneti megoldás a növények számára, hosszú távon nem nyújt kiutat a redox egyensúly felbomlását tekintve. Ezen eltolódás legfőbb következménye ugyanis a reaktív oxigénszármazékok (ROS) felhalmozódása, amelyek károsan hatnak a növényi sejtekre, szövetekre. Ez az oxidatív stressz.

3.8. Az aszkorbát-glutation ciklus szerepe az oxidatív stressz mint másodlagos stresszfaktor kivédésében

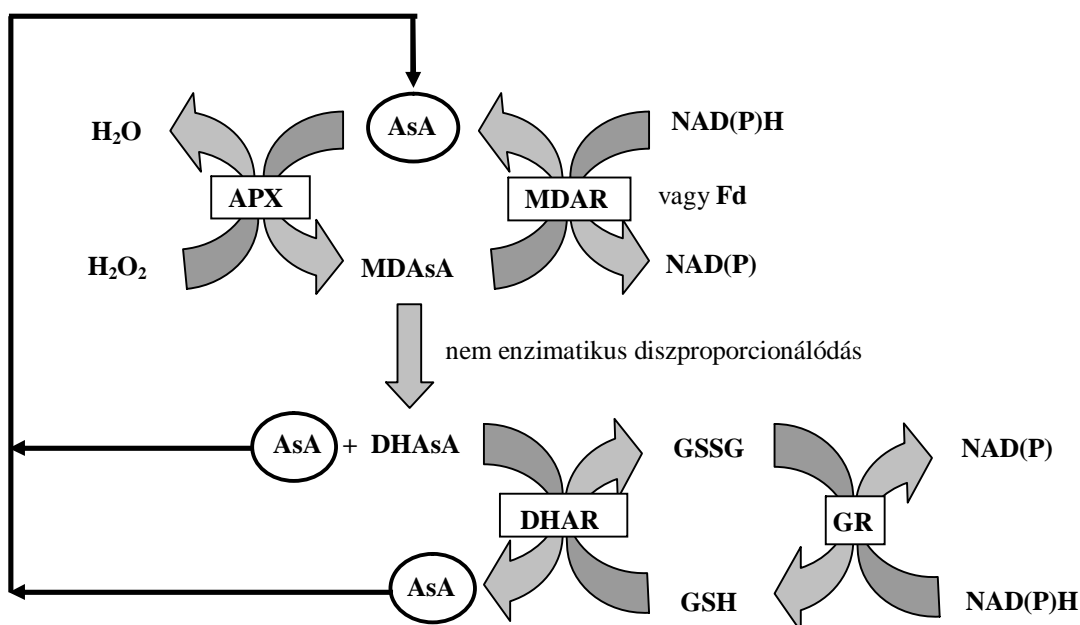
A sztómák záródásának, továbbá a csökkent CO_2 -koncentrációnak egyik káros következménye, hogy az elektronok akceptora a CO_2 helyett a molekuláris oxigén (O_2) lesz. Ezáltal megnövekszik ROS-szintézis, megnőhet a szuperoxid-gyökanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a hidroxilgyök (OH^{\bullet}) koncentrációja (Asada 1999). Jelenlétük erősen előnytelen a sejt számára, mivel nagymértékű reakcióképességük következtében

károsítják a makromolekulákat: a fehérjéket, a lipideket, a nukleinsavakat, aminek végső következménye a sejt halála. A növények – hogy megelőzzék ezt a folyamatot – egy komplex, antioxidáns védekezési rendszert állítottak fel, melynek enzimatikus és nem enzimatikus résztvevői ismertek. A legfontosabb, a ROS-ok eliminálásában szerepet játszó enzimek a szuperoxid-dizmutáz (SOD; ld. 3.5.4. fejezet), az aszkorbát-peroxidáz (APX) és a kataláz (CAT; ld. 3.5.4. fejezet). E fehérjék képesek „semlegesíteni” a $O_2^{\cdot-}$ -t és a H_2O_2 -t, megakadályozva ezzel a leginkább oxidáló hatású OH^{\cdot} képződését (Scandalios 1993; Foyer és mtsai 1994; Asada 1999). A nem enzimatikus csoport két, legfontosabb tagja a glutation (GSH) és az aszkorbinsav (AsA) (Noctor és Foyer 1998).

Az AsA tehát kulcsszerepet játszik az oxidatív stressz kivédésében, mely történhet i) közvetlen módon, amikor a szabadgyököket közvetlenül oltja ki, és ii) közvetett úton, amikor elektrondonorként szerepel az APX által katalizált reakcióban, amely során a H_2O_2 redukálódik. A H_2O_2 -ből víz lesz, míg az AsA-ból monodehidro-aszkorbátgyök (MDAsA), amely háromféleképpen alakulhat vissza AsA-vá: i) vagy a monodehidroaszkorbát-reduktáz (MDAR) általi redukcióval, vagy ii) az első fotokémiai rendszerben található, redukált ferredoxin által (Asada 1999), vagy pedig iii) spontán diszproporcionálódással, amikor két MDAsA egy AsA-vá és egy dehidroaszkorbáttá (DHAsA) alakul. A DHAsA is visszaalakítható AsA-vá, mégpedig a GSH-függő dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR) által. A redukcióban részt vevő GSH oxidálódik (GSSG), amelyet a glutation-reduktáz (GR) alakít vissza redukált formába, amihez NAD(P)H-t használ elektrondonorként. A fent említett folyamatok alkotják az aszkorbát-glutation (AsA-GSH) ciklust (3. ábra).

Számos irodalmi adat alapján tudjuk, hogy a ciklus egyes enzimeinek aktivitása fokozódik különböző, környezeti stresszhatás jelenlétekor, és ez a válaszreakció összefüggésbe hozható a stressztoleranciával (pl. Lascano és mtsai 2001). Ha figyelembe vesszük még azt a tényt, hogy e reakció egyike a növény stresszre adott, korai válaszainak, akkor az antioxidáns rendszer válaszai alkalmazhatók lehetnek mint szelekciós jellemzők a stressztoleráns fajták kiválogatásában (pl. Guo és mtsai 2006).

Bonyolultabbá teszi az egész rendszert, hogy a ciklus enzimeinek mindegyike egy-egy enzimesaládot alkot, vagyis az egyes izoenzimek más-más sejtkompartimentben fordulnak elő, biztosítva ezzel a minél hatékonyabb oxidatív stressz elleni védekezést.



3. ábra. Az AsA-GSH ciklus sematikus ábrája. AsA – aszkorbinsav, MDAsA – monodehidro-aszkorbátgyök, DHAAsA – dehidroaszkorbát, APX – aszkorbát-peroxidáz, MDAR – monodehidroaszkorbát-reduktáz, DHAR – dehidroaszkorbát-reduktáz, GSH – glutation, GSSG – oxidált glutation, GR – glutation-reduktáz, Fd – redukált ferredoxin.

APX-ek legalább négy sejtszervecskében találhatók: a kloroplasztisz sztrómájában (sAPX), a tilakoid-membránhoz kötötten (tAPX), a mikroszómák (glioxiszóma és peroxiszóma) membránjához kötötten (mAPX), valamint a citoszólban (cAPX) (Shigeoka és mtsai 2002). A kloroplasztisz-specifikus APX egyébként a mitokondriumba is szállítható (Chew és mtsai 2003). Egyre jobban ismert az egyes APX izoenzimek szerepe a környezeti stressz kivédésében, amelynek vizsgálatát egyszerűbbé tette különböző mutánsok alkalmazása. Pl. Davletova és mtsai (2005) így kapták azokat az eredményeket, amelyek alapján kijelentették, hogy *Arabidopsis*-ban a cAPX1 képezi a ROS-metabolizmus középpontját. Hiányában egyszerűen összeomlott az egész kloroplasztiszbéli H_2O_2 -elimináló rendszer – megnőtt a H_2O_2 szintje, a fehérjék oxidálódtak. Ezzel szemben Miller és mtsai (2007) arról számoltak be, hogy az egyes izoenzimek génjeinek kiütése (esetükben a cAPX1 és a tAPX együtt és külön-külön) nem feltétlenül vezet a makromolekulák nagyarányú károsodásához, inkább ilyenkor átrendeződnek az egyes jelátviteli utak, biztosítva ezáltal a megfelelő védelmet. Vagyis egyfajta plaszticitás jellemzi a ROS-jelátvitelt *Arabidopsis*-ban. Ehhez hasonló ellenmondásokat találtak rizs esetében is, ami arra enged következtetni, hogy egy fajon belül az egyes APX izoformák

másképp szabályozódnak a fajtától, a növény korától, a növényi szervtől, illetve a nevelési feltételektől függően (Hong és mtsai 2007).

Az MDAR-ok növényi sejten belüli kompartmentáltsága fontos az AsA megfelelő redox állapotának fenntartásában. MDAR izoenzimiek aktivitását írták le a kloroplasztiszbán, a mitokondriumban, a peroxiszómában, a citoszólban, valamint a plazmamembránhoz, illetve a sejtfalhoz kapcsoltnak (Dalton és mtsai 1993; De Leonardis és mtsai 1995; Mittova és mtsai 2000). Aktivitásuk, illetve transzkriptszintjük is változhat különböző fajok más-más szervében, különféle környezeti stresszhatások jelenlétékor. Aktivitásuk általában megnő (Bartoli és mtsai 2006; Sharma és Dubey 2007) a stressz elleni védekezésben, biztosítva ezzel az elegendő mennyiségű redukált aszkorbátot az APX számára. Ugyanígy génjeik mRNS-szintjének emelkedését is kimutatták különböző abiotikus stresszorok hatására - citoszolikus, kloroplasztiszos/mitokondriális (Chew és mtsai 2003; Yoon és mtsai 2004) és peroxiszóma sztrómájában előforduló MDAR-oknak (Leterrier és mtsai 2005).

A DHAR-ok szintén az oxidált aszkorbát redukálttá való visszaalakításában vesznek részt. Shigeoka és mtsai (2002) a kloroplasztisz sztrómájában és a citoplazmában található izoenzimokről számoltak be. A stressz kivédésében való jelentőségüket erősíti számos publikáció, melyben a szerzők a stresszor által kiváltott aktivitás-növekedésről számolnak be (pl. Burritt és mtsai 2002; Lai és mtsai 2007). Az enzim megnövekedett aktivitása mellett párhuzamosan a transzkriptszintje is megemelkedhet. Baek és Skinner (2003) számolt be a kloroplasztiszbán található izoforma megnőtt kifejeződéséről hidegstressz során.

A GR-ek biztosítják a redukált glutationt többek között a DHAR-ok számára a DHAsA redukálásához. Teszik mindezt a kloroplasztiszok sztrómájában, illetve a citoplazmában mint sGR és cGR (Shigeoka és mtsai 2002). Az előző három enzimsoporthoz hasonlóan a GR-nél is megfigyeltek aszály-, illetve ozmotikus stressz hatására bekövetkező aktivitás-növekedést - a szárazságrezisztens búzafajtánál hatékonyabb volt a GSSG-redukció, mint a szárazságérzékeny fajta esetében (Lascano és mtsai 2001).

3.9. A gyökér szerepe az aszályhoz való alkalmazkodásban

Jól fejlett, a gyökérhosszal és a vastag gyökerek számával jellemezhető gyökérzet szükséges ahhoz, hogy a növény kiaknázza a földből a még elérhető vizet a benne lévő

tápanyagokkal egyetemben és biztosítsa a növény föld feletti részének is a megfelelő fejlődését. A növények egyik szárazság-elkerülő (drought avoidance) stratégiája a mélyreható, vastag gyökérzet kifejlesztése, mellyel a mélyebb rétegekbe is le tudnak hatolni, biztosítva ezáltal a folyamatos vízellátást (Tari és mtsai 2003). A nedvesség felé irányuló növekedést hidrotropizmusnak nevezzük, melyet a nedvesség-grádiens érzékelése előz meg. E folyamatnak a fő szerve a gyökérsüveg (azon belül pedig a kolumella sejtek), ami egyébként a többi tropizmus, pl. gravitropizmus lefolyását is koordinálja. A növényi hormonok közül az ABS és az auxin szerepe kiemelendő a folyamat lezajlásában. Az ABS fenntartja a magasabb növekedési arányt a gyökér azon oldalán, ahol az alacsonyabb vízpotenciált érzékeli a növény (Takahashi és mtsai 2002). Az ABS pozitív hatását bioszintézis-enzymeinek túltermelésével is alátámasztották (Thompson és mtsai 2007). Az auxin szerepe a gravitropizmusban már régóta ismert, viszont a víz, illetve a gravitáció által irányított mozgás gyakran ütközik egymással. Eapen és mtsai (2005) feltételezték, hogy az ABS befolyásolhatja az auxin transzportját, illetve antagonizálhatja a gyökerek gravitációra adott válaszában korai jelátvitelét csökkent talajvíztartalom esetén.

A gyökércsúcs mögötti régió növekedésének hátterében a sejtek megnyúlása áll, amely csak a gyökér megnyúlási zónájában valósul meg, míg más részei gátoltak ilyen szempontból (Fan és Neumann 2004). Az expanzió megvalósulásának elsőszámú helye a növényi sejt fala, amely a folyamat során számos átalakuláson megy keresztül. Mindebben fontos szerepet játszanak a sejtfa-összetevők, pl. poliszacharidok, fehérjék. A sejtfa-alkotó főbb poliszacharidok a cellulóz, a hemicellulóz és a pektin. A cellulóz-mikrofibrillumok hemicellulózszálakkal kapcsolódnak egymáshoz, így egy hálózatot képeznek, mely a pektinmátrixba ágyazódik. Az egyik leggyakoribb hemicellulóz a xiloglükán, a fűvek sejtfalában viszont az arabinoxilán, a glükuron-arabinoxilán és a β -glükán dominál. A növényi sejtfa vázát tovább stabilizálják a szerkezeti fehérjék, melyekre általánosan jellemző a glükoziláltság. Ilyen proteinek a hidroxiprolinban gazdag glükoproteinek (HRGP), az arabinogalaktán fehérjék (AGP), a glicinben (GRP), illetve a prolinban (PRP) gazdag proteinek. A sejtfa vázának meglazítása elsődleges a megnyúlási folyamatban, amely egy savas közeget igényel (pH 5.2; savas növekedés - acid growth). Ezt a sejt protonpumpákkal oldja meg, melyek a sejt belsejéből juttatják a H^+ -okat a sejtfalba. A protonkiválasztást az auxin kétféleképpen fokozhatja - vagy a meglévő H^+ -ATPázokat aktiválja, vagy újak szintézisét serkenti. Az alacsony pH a sejtfa-alkotó fehérjék, az expanzinok működéséhez szükséges, amelyek a cellulóz-mikrofibrillumok közötti, nem kovalens kötéseket lazítják fel. A növényekben négy családba sorolják az

expanzinokat: két család vesz részt a sejtmegnyúlásban - α - (EXPA) és β -expanzinok (EXPB) -, a másik kettő funkciója még ismeretlen - expanzin-szerű A (EXLA) és B (EXLB) fehérjék. A β -expanzinok e funkciójából adódóan közreműködnek a gyökérszőrök kialakulásában is (Kwasniewski és Szarejko 2006). A sejtfa szerkezetének módosításában enzimek is részt vesznek. Egyik fontos enzim a xiloglükán-endotranszglükóziláz (XET), amely a xiloglükánok gerincvázát egy bizonyos ponton elvágja, majd egy másik láncal kiegészíti. Ily módon hosszú polimerek képződnek, amelyek elősegítik a megnyúlás folyamatát. A *XET* gén magas kifejeződését írták le aktív falátalakulás során több fajban is (pl. Yokoyama és mtsai 2004). A glükózidázok a hemicellulózok oldalláncait távolítják el, miáltal azok könnyebben tapadhatnak a cellulóz-mikrofibrillumok felszínéhez, pl. az endo-(1,4)- β -D-glukanáz.

3.10. A búza transzkriptomikája

A búzát hexaploid mivolta (A, B és D genom, Bennett és Leitch 1995), valamint nagy genommérete (16.8 Mbp) ellenére is behatóan tanulmányozzák a gének kifejeződésének vizsgálata céljából. Hátráltató tényezőnek számít továbbá, hogy a búza genomját a mai napig nem szekvenálták meg teljesen, valamint genetikai állományának nagy része (becslések szerint 75%) ismétlődő szekvenciákból tevődik össze (Mitra és Bhatia 1973). Az átfogó génkifejeződési vizsgálatokra alkalmas fontosabb módszerek:

1. SAGE (serial analysis of gene expression)
2. MPSS (massively parallel signature sequencing)
3. Macro-és microarray - a két technika a DNS-pontok nagyságában, a pontokat hordozó minőségében és a vizsgált minta jelölési módjában különbözik.

Az array-eket tovább csoportosíthatjuk a hordozón lévő próbák hossza szerint. Így megkülönböztetünk:

1. cDNS-eket tartalmazó array-eket (pl. az általunk alkalmazott árpa cDNS-macroarray),
2. Rövid (általában ~ 25 nt) oligonukleotidokat tartalmazó array-eket (pl. Affymetrix Genechip®),
3. Hosszú oligonukleotidokat (60-70 nt) tartalmazó array-eket (pl. az általunk tervezett oligonukleotid-microarray/oligo-chip).

A búza transzkriptomikájának vizsgálata során egyes kutatócsoportok cDNS-array-t használtak (pl. Wilson és mtsai 2004), míg mások hosszú oligonukleotidokat tartalmazó

array-vel dolgoztak (pl. Kawaura és mtsai 2006). Az így kapott eredmények validálását vagy Northern blot analízissel, vagy kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR-rel végezték. Az eddigi publikációk révén ismereteink vannak azon génekről, melyek megváltozott kifejeződést mutattak búzában többek között sóstressz (pl. Kawaura és mtsai 2006), alacsony hőmérséklet (pl. Winfield és mtsai 2010), aszály (pl. Aprile és mtsai 2009), vagy több, abiotikus stresszor együttes hatására (pl. Szűcs és mtsai 2010).

A vízmegvonás génkifejeződésre tett hatását számos kutatócsoport vizsgálta már mind hajtásban (pl. Xue és mtsai 2006), mind gyökérben (pl. Mohammadi és mtsai 2007), mind szemtermésben (pl. Szűcs és mtsai 2010), keresve azokat a géneket, melyek felelősek lehetnek a szárazságtűrés kialakulásáért. Eddigi ismereteink alapján a mai napig nem tanulmányozták még az őszi búza gyökereiben zajló génexpressziós változásokat hosszú távú (heteken át tartó), mérsékelt vízhiány esetén. Mi erre kerestük a választ.

4. Célkitűzés

A szárazságstressz által kiváltott válaszok hátterében nagyszámú gén kifejeződésének a megváltozása áll. Egyes gének megnövekedett, míg mások visszafogott expresszióval reagálnak a stresszhatásra. Az, hogy melyik éppen hogyan viselkedik, nagymértékben függ a vizsgált fajtól, fajtától. Ez méginkább fennáll olyan fajták esetében, melyeket stressztűrőként, illetve stresszre érzékenynek írtak le. E tényekből kiindulva indultunk neki kísérleteinknek, és kezdtük el vizsgálni a búzát mint mezőgazdaságilag fontos növényt, valamint az aszály rá gyakorolt hatását. Ez utóbbi vizsgálatok jelentőségét Földünk klímájának változása, és ennek következtében várható még jelentősebb aszálykárok mérséklésének igénye adja.

Konkrét célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. Két, szárazságstresszre toleráns búzafajta összehasonlítása, melyek közül az egyik egy őszi, „adaptív” genotípus, a másik pedig egy fakultatív, „elkerülő” stratégiát követő tájfajta. Milyen gének kifejeződése jellemzi az egyik, illetve a másik búzafajta gyökerét hosszú távú, mérsékelt aszálystressz során?
2. Két-két, eltérő jellegű stressztoleranciával bíró búzafajta génkifejeződési mintázatának összehasonlítása a tapasztalataink alapján „finomított” kísérleti rendszerben, kiegészítve különböző élettani mérésekkel. Milyen gének kifejeződése jellemzi a szárazságstresszre ellenálló, illetve érzékeny fajták gyökerét? Ez összefüggésbe hozható-e bizonyos élettani paraméterek változásaival? Találunk-e „toleranciagén(ek)e)t”, amely(ek) egyöntetűen különbséget mutat(nak) a toleráns és szenzitív genotípusok között?
3. Két, eltérő jellegű stressztoleranciával rendelkező búzafajta összehasonlítása. Hogyan változik az AsA-GSH ciklus enzimeinek transzkriptszintje - izoenzimek szintjére lebontva - a két genotípus hajtásában hosszú távú, mérsékelt aszálystressz során?

5. Anyag és módszer

5.1. A munkánk során gyakran használt oldatok összetétele

1. Hoagland-tápoldat (1x):

NH ₄ H ₂ PO ₄	150 mg/l
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	656 mg/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	240 mg/l
KNO ₃	606 mg/l
Fe-EDTA	2.5 ml/l
Mikroelemek	1 ml/l

Mikroelemek:

H ₃ BO ₃	2.86 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.08 mg/l
Na ₂ MoO ₄	0.03 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.22 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1.81 mg/l

2. TBE-puffer gélelektroforézishez (1x):

Tris bázis	10.8 g/l
H ₃ BO ₃	5.5 g/l
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	0.74 g/l

5.2. A munkánk során használt búzafajták rövid ismertetése

1. *Triticum aestivum* L. cv. Plainsman V – közepes hozamú, minőségi termést hozó, szárazságtűrő, észak-amerikai, őszi búzafajta. Forgalomba hozatalának éve: 1974. Forrás: Cseuz László, Gabonakutató Nonprofit Kft., Szeged.

2. *T. aestivum* L. cv. Cappelle Desprez – intenzív búzatermesztésben magas hozamot hozó, szárazság-érzékeny, francia, őszi búzafajta. Forgalomba hozatalának éve: 1946. Forrás: Cseuz László, Gabonakutató Nonprofit Kft., Szeged.

3. *T. aestivum* L. cv. Jing-411 – szárazság-érzékeny, észak-kínai, őszi búzafajta. Forgalomba hozatalának éve: 1991. Forrás: Aimin Zhang, Kínai Tudományos Akadémia Genetikai és Fejlődésbiológiai Intézete, Peking.

4. *T. aestivum* L. cv. Xiaoyan-54 – stressztűrő, kínai, őszi búzafajta. Forrás: Aimin Zhang, Kínai Tudományos Akadémia Genetikai és Fejlődésbiológiai Intézete, Peking.

5. *T. aestivum* L. Kobomugi – Belső-Ázsiából származó, fakultatív tavaszi tájfajta. Forrás: Prof. Dr. Erdei László, Szegedi Tudományegyetem, Növénybiológiai Tanszék.

5.3. Növények nevelése

5.3.1 Búzafajták nevelése perlitben

A kísérlet célja: növekedési, élettani és génkifejeződési adatok nyerése az egyes, szárazságstressznek kitett búzafajtákról.

A kísérletet három búzafajtával végeztük: cv. Plainsman V, cv. Cappelle Desprez és Kobomugi. Háromnapos csíráztatást követően az egyes búzafajták csíranövényeit tizenötösével ültettük nedves perlitet tartalmazó cserepekbe (cserépméret: 18x18x18 cm, azaz kb. 3.2 l perlit). Két hétig előneveltük őket: 300 ml 1-szeres töménységű Hoagland-táppoldattal való öntözés hetente kétszer; megvilágítás: 16 óra fény ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/ 8 óra sötétség; hőmérséklet: 16°C/21-24°C (éjjel/nappal); relatív páratartalom: 60-70%. A két hét letelte után a cserepeket két csoportba osztottuk: a stresszelt csoport 50 ml 1-szeres töménységű Hoagland-táppoldatot kapott négy héten át heti kétszeri öntözéssel, míg a kontroll csoport tovább kapta a kezdeti 300 ml-t. Hetente gyűjtöttünk mintákat a stresszelt növényekből (cserép/fajta/hét), majd a negyedik héten a kontroll cserép növényeit is learattuk. Tehát összesen hatféle mintát gyűjtöttünk be a kísérlet során minden egyes fajtaból: kezdeti kontroll az első két hét után (Cont), stresszelt növények mintái az első (1w), második (2w), harmadik (3w) és negyedik héten (4w), valamint a negyedik hetes kontroll növények mintái (Cont 4w).

5.3.2 Búzafajták nevelése homok-perlit 2:1 arányú keverékében

A kísérlet célja: növekedési, élettani és génkifejeződési adatok nyerése az egyes, szárazságstressznek kitett búzafajtákról.

A kísérletet 4 búzafajtával végeztük: Plainsman V, Cappelle Desprez, Jing-411, Xiaoyan-54. A háromnapos csíranövényeket 6-osával ültettük a homok-perlit 2:1 arányú keveréket tartalmazó cserepekbe (átmérő: 12cm; űrtartalom: 1.2 l), amelyeket előzőleg vízzel telítettünk (100% talaj-vízkapacitás \rightarrow 0.257 kg/kg). Az előnevelés 80% talaj-vízkapacitású (80% FC) talajban folyt két héten át. Ezt követően a stresszelt növények nem kaptak táppoldatot – a talajuk vízkapacitása a vízmegvonás második hetére esett vissza 40%-ra (40% FC). A továbbiakban a 40% vízkapacitás mellett mért tömegre naponta locsoltuk vissza a cserepeket. Az öntözés három szivárgó csövön keresztül történt a talajfelszíni gyökeresedés elkerülése végett. Ezzel párhuzamosan a kontroll növények

továbbra is a 80%-os talaj-vízkapacitáson nevelődtek. A nevelés körülményeit (világítás, hőmérséklet, relatív páratartalom) tekintve megegyezett az előző kísérlet paramétereivel. Ebben az esetben négyféle mintát gyűjtöttünk be: a vízmegvonás második (2w 40%) és negyedik hetes (4w 40%) mintái, valamint a hozzájuk tartozó kontrollminták (2w és 4w 80%).

5.4. Molekuláris vizsgálatok

5.4.1. cDNS-macroarray vizsgálat

A totál RNS-ek kivonását TRI reagenssel végeztük (Sigma, St. Louis, MO, USA) a gyártó instrukciói szerint, mind a stresszelt, mind a kontroll növények gyökeréből. A ³³P-jelölt cDNS-ek szintézise Sreenivasulu és mtsai (2002) leírása alapján történt.

A macroarray-hibridizációt a Gatersleben-i Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung-ban (IPK) végezték Potokina és mtsai (2002) módszerével. Apróbb változtatásokkal dolgoztak: i) a hibridizáció maga 65°C-on, legalább 18 órán át történt; ii) a hibridizáció után a cDNS-array-eket először 1-szeres SSC-, illetve 0.1%-os SDS-oldattal mosták 65°C-on 20 percig, majd 0.5-szörös SSC és 0.1%-os SDS elegyével szintén 65°C-on és szintén 20 percig. Az egyes membránpárok 10450 egyedi cDNS-próbát tartalmaztak kétszeri ismételtsben (technikai ismételts), az egyes próbák szekvenciaadatai megtalálhatók a <http://www.pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/> internetes oldalon. Tizenkét különböző, gyöker eredetű mintát hibridizáltattak, kétszeri ismételtsben (biológiai ismételts). A detektálást és a pontok intenzitásának számszerűsítését az Array Vision (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada) programcsomaggal végezték egy „phosphoimager” felhasználásával. A jelintenzitást a teljes, kötött radioaktív mennyiséghez normalizálták, valamint az egy klónhoz tartozó két, technikai ismételts átlagolták. A további adatkiértékelés egy Excel-alapú alkalmazással történt, amit Dr. Miskolczi Pál (MTA SZBK Növénybiológiai Intézet) fejlesztett ki. Az adatokat többféle szűrőn engedték át. Azokat a próbákat kerestük, melyek jelintenzitása legalább kétszer akkora volt, mint a háttér, továbbá a két, technikai ismételts aránya nem haladta meg a kétszeres értéket. A biológiai ismételts tekintetében szintén kizártuk a kétszeresnél nagyobb arányt mutató próbákat. Mindezek után következett a szárazságstressz által indukált, illetve represszált kifejeződésű cDNS-próbák kiválogatása: minimumnak tekintettük a kétszeres, felfelé (indukált) vagy lefelé (represszált) irányuló változásokat a mintasorozat legalább egyik

tagjánál, a kezdeti kontrollértékhez viszonyítva. Az azonos kifejeződés-mintázatú próbákat rendszereztük a *k*-közép algoritmus segítségével (J-Express 2.6, <http://www.molmine.com>).

5.4.2. Oligonukleotid-microarray vizsgálat

A csoportunk által megtervezett búza oligonukleotid-microarray közel 15 ezer szekvenciát tartalmaz. Az oligótervezés alapjául szolgáló géneket különböző szempontok alapján választottuk ki:

- a szakirodalomból ismert, stressz által indukált gének vagy géncsaládok búzából: többek között LEA gének (pl. Brini és mtsai 2007), GST-eket (Gallé és mtsai 2009), aquaporinokat (pl. Hachez és mtsai 2006), CIPK-kat (pl. Xiang és mtsai 2007), antioxidáns enzimeket (pl. Asada 1999), transzkripciósfaktorokat (pl. Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki 2006), patogenezissel kapcsolatos fehérjéket (pl. Lee és mtsai 2008), receptorszerű protein-kinázokat (pl. Morillo és Tax 2006), ozmotikumok szintézisének enzimeit kódoló gének (Chen és Murata 2002);
- a rizsben prediktált, stressz-indukálható promóterű gének búza ortológjai (Cserhádi Mátyás, leközöletlen eredmény);
- a magfeltöltődésben szerepet játszó gének (Szűcs Attila, PhD dolgozat, 2008);
- ismert, rizs sejtciklus gének és géncsaládok (Pettkó-Szandtner Aladár, leközöletlen eredmények);
- a lipidanyagcserében résztvevő gének (Kiss Mihály, Galiba Gábor, leközöletlen eredmények);
- az árpa cDNS-macroarray során szárazság-indukciót mutató gének búza ortológjai (Sečenji és mtsai 2010b);
- búza Affimetrix-chipen aszálystressz-indukciót mutató gének (Dongcheng Liu, leközöletlen eredmények);
- *in silico* keresések során kapott, stressz-indukált génjelöltek - a válogatás alapja az volt, hogy a TC-ek (tentative consensus) alkotó EST (expressed sequence tag) szekvenciák zöme (75%) abiotikus stressznek kitett cDNS-könyvtárakból származott (Cserhádi Mátyás, leközöletlen eredmény);
- kontrollként szolgáló gének, melyek kifejeződését nem befolyásolja a vízmegvonás (konstitutív gének) - a macroarray adatokra alapozva (Sečenji és mtsai 2010b).

A kiválasztott géneket reprezentáló, a TIGR (The Institute for Genomic Research) búzaadatbázisából (10-es verzió, 2005.02.10.) származó TC, illetve EST-szekvenciákra 50-70 nt hosszú oligókat terveztünk (Array Designer 4.0, Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) a szekvenciák közötti esetleges hasonlóságot is figyelembe véve, azaz:

1. A szekvenciák közötti eltérés $\leq 5\%$ - feltételeztük, hogy ugyanazt a fehérjét kódolják a szekvenciák (allélvariánsok, fajtapolimorfizmus, géncsalád közeli, rokon tagjai), ezért közös oligót terveztünk rájuk;

2. A szekvenciák közti eltérés 5-20% - olyan helyre terveztünk közös oligót, ahol a legnagyobb hasonlóság volt az átfedő szekvenciák között; ha ilyen oligó nem volt tervezhető, akkor a rokon szekvenciákra is egyedi oligót terveztünk;

3. A szekvenciák közti eltérés $\geq 20\%$ - egyedi, specifikus oligót terveztünk minden egyes szekvenciára.

Az így kiválasztott gének és a rájuk tervezett oligók azonosítói, illetve DNS-szekvenciái a dolgozat CD-mellékletén Excel-táblázatban megtalálható.

Az így kapott 12976 oligón túl a chip ismételéseket is tartalmaz, melyek elsősorban technikai ellenőrzést szolgálnak. Ilyen ismételések voltak – esetünkben – ugyanazzal az azonosítóval felvitt oligók (a gyártó által, random módon felvitt ismételések – 336 db); az általunk, random módon kiválasztott kétszer, de különböző azonosítóval felvitt oligók (394 db); egyes kiválasztott génekre egy második oligó tervezése és felvitele, különböző azonosítóval ellátva (1270 db). Az Agilent cég (Santa Clara, CA, USA) gyártotta le az általunk megtervezett oligókból, valamint a saját könyvtárából származó 768 minőség- és negatív kontrollból álló mikroszkóp tárgylemez formátumú 8 x 15K chipet (eArray, <http://www.genomics.agilent.com>).

Kísérletünkben nyolc búzafajta négyhetes gyökérmintájával dolgoztunk, vagyis mindegyiknél a kéthetes stressznek kitett (2w 40%) és a hozzá tartozó kontroll mintát vizsgáltuk (2w 80%).

Az egy szálú cDNS-t a totál RNS 1 μ g-jából szintetizálták 10 μ l térfogatban, oligo(dT) és ArrayScript reverz-transzkriptáz (Ambion, Austin, TX, USA) felhasználásával. Ezt követően a cDNS második szálát 50 μ l végtérfogatban állították elő DNS-polimeráz segítségével RNáz H (Ambion) jelenlétében. A dupla szálú cDNS képezte a mintát az amino-allil módosított, amplifikált RNS előállításához, ami tk. egy amino-allil rUTP jelenlétében lezajló *in vitro* transzkripció T7 RNS polimeráz (T7 Enzim Mix, Ambion) alkalmazásával. Az így kapott amplifikált RNS 6 μ g-ja képezte az észterező

jelölés alapját, amelynek eredményeként kapták a Cy5 (vörös) és Cy3 (zöld) fluoreszcens festékekkel jelölt mintákat. Mindezt az AminoAllyl MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit (Ambion) felhasználásával végezték a gyártó előírásai szerint. A jelölt minták még egy RNS-tisztító affinitás-oszlopon mentek át a hibridizáció kivitelezése előtt (Macherey Nagel, Düren, Germany), majd meghatározták a koncentrációjukat (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) és a beépült festék mennyiségét fotometrálással (Cy3 - 550 nm, Cy5 - 650 nm). Ez utóbbi mérés alapján csak azon mintákat használták fel a hibridizáláshoz, melyeknél az 1000 nt-ra jutó festékmolekulák száma 30 és 60 közé esett. A fent leírt stratégiát két ismétlésben végezték el: egyszer a stressznek kitett növényekből származó mintákat jelölték Cy5 festékekkel, a kontroll egyedekből származókat pedig Cy3-mal, majd fordítva.

A hibridizáció során két darab, nyolc identikus blokkot tartalmazó chipet használtunk, ahol a blokkok mindegyike tartalmazta a 15744 szekvenciát. A nyolc búzafajta estében egy blokk képviselt egy fajtát, egy blokkon belül pedig az egyik fajta festékekkel jelölt minta képviselte a stresszkezelt növényeket, míg a másikkal jelölt a kontroll növényeket. A másik chipen ugyanezen mintákat ellenkező színnel jelölve ismételték meg a hibridizációt (color-flip). Az eredmények részletes kiértékelését csak azon a 4 fajtán végeztük el, melyek az élettani méréseinknek is alanyai voltak (Plainsman V, Cappelle Desprez, Xiaoyan-54, Jing-411). Az egyes blokkok felszínére 300 ng tisztított, jelölt amplifikált RNS került a Gene Expression Hybridization Kit felhasználásával (Agilent Technologies). Maga a hibridizáció egy hibridizációs kamrában zajlott le (Agilent Technologies), 17 órán keresztül, 65°C-on, folyamatos kevertetés mellett (~5 rpm). A hibridizáció után következett a mosás, melyhez kétféle mosópuffert használtak: először szobahőmérsékleten 1 percig (Gene Expression Wash buffer 1, Agilent Technologies), majd 37°C-on szintén 1 percig (Gene Expression Wash buffer 2, Agilent Technologies), majd szárították a lapokat. Az egyes blokkok leolvasását lézer szkennelrel végezték (Agilent Scanner) a beépített XDR (Extended Dynamic Range) funkciót használva, 5 µm-es felbontásban. A leolvasás 543 nm (Cy3) és 633 nm (Cy5) hullámhosszokon történt, a kapott képeket pedig a Feature Extraction v1.1 programmal (Agilent Technologies) értékelték ki.

Az azonos kifejeződésű géneket hierarchikus klaszterezéssel rendszereztük McQuitty módszerét használva (PermutMatrix 1.9.3, <http://www.lirmm.fr>, Caraux és Pinloche 2005).

5.6. Aminósav-szekvenciák összehasonlítása

A különböző búza *APX*, *MDAR*, *DHAR*, *GR* enzim izoformák nukleotid-szekvenciáit BLAST-technikával kutattuk fel a TIGR Plant Transcript Assemblies (TA) (Childs és mtsai 2007) adatbázisban (2-es verzió, 2007.07.10., <http://plantta.jcvi.org/>). Ehhez már ismert, a GenBank adatbázisban szereplő szekvenciákat használtunk fel, melyek vagy búzából, vagy más fajokból származtak. Más fajokként említendő az árpa (*Hordeum vulgare* L.), a rizs (*Oryza sativa* L.) és a spenót (*Spinacia oleracea*). A hasonlósági fa létrehozásához búza TA-kat használtunk, melyek azonosítója „TAszám_4565” alakként szerepel az adatbázisban, ahol a *szám* az adott TA egyedi számszerű azonosítója, míg a 4565 a búza NCBI (National Center for Biotechnology Information) taxon-azonosítója. A TA-k feltérképezése után meghatároztuk minden egyes nukleotid-szekvenciának a hozzá tartozó aminósav-szekvenciáját (ExPASy Proteomics Server, <http://www.expasy.org/>). Az egyes géncsaládok esetében ez eltérő hosszúságú polipeptidet jelentett: *APX* – 252 aa, *MDAR* – 308 aa, *DHAR* – 200 aa, *GR* – 340 aa. A kapott, származtatott aminósav-szekvenciák többszörös illesztése képezte a hasonlósági fa megalkotásának alapját, ez utóbbihoz a szomszéd-kapcsolati módszert használtuk (ClustalW, <http://clustalw.genome.jp/>), a vizualizáláshoz pedig a Treeview nevű program 1.6.6-os verzióját alkalmaztuk. Továbbá csak azon TA-k, illetve a belőlük származtatott polipeptidek képezték a fa vázát, amelyeknek teljes volt a szekvenciája, a részleges TA-k utólag váltak a fa részévé a vázalkotó TA-khoz való hasonlóságuk alapján. A hasonlósági fákon túl igénybe vettük még olyan tranzitszekvencia predikciós programok segítségét is, melyek eredményei alátámasztották az egyes izoformák feltételezett, sejten belüli előfordulását. A következő predikciós programokat alkalmaztuk: TargetP v1.1 (Emanuelsson és mtsai 2000), iPSORT (Bannai és mtsai 2002), Predotar (Small és mtsai 2004), SignalP v3.0 (Bendtsen és mtsai 2004), BaCello (Pierleoni és mtsai 2006).

5.4.4. cDNS-szintézis; valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripció PCR (RT-qPCR)

A totál RNS-ek 2 µg-jából szintetizáltunk cDNS-t RevertAid H minus M-MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas) enzim felhasználásával a gyártó előírásai alapján. A szintézis megkezdéséhez random hexamer primereket használtunk, továbbá vakreakciókat is beiktattunk az enzim kihagyásával. A Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) elegyet, valamint az 5-5 pmol forward, illetve reverse

primereket tartalmazó RT-qPCR-reakciókhoz (20 µl) 9 µl, 1:45-szeres hígítású cDNS-oldatot adtunk. Mindezt háromszor ismételtük meg, valamint cDNS-t nem tartalmazó vakpróbákat is lefuttattunk. A RT-qPCR lefuttatásához az ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) berendezést használtuk a következő működési protokollal: 95°C-on 10 percig; 45 ciklus 95°C-on 15 mp-ig, majd a kapcsolódás (annealing) szakasza 60°C-on 1 percig. Az amplifikáció specificitását kétféle módon ellenőriztük: i) egyetlen olvadáspontú terméket jelző csúcs jelenléte a lefutási görbén (ABI Prism Dissociation Curve Analysis Software); ii) egyetlen sáv az agaróz gélen gélelektroforézis után. A munkánk során kiválasztott és vizsgált géneket, illetve géncsoportokat detektáló specifikus primerek szekvenciáit az 1. táblázat foglalja össze. A RT-qPCR során kapott értékeket kétszeresen normalizáltuk: i) a 18S rRNS-hez mint referencia génhez; ii) az adott kísérletben meghatározott kontroll mintához (a részletekről bővebben az adott kísérlet eredményeinek leírásánál). A relatív transzkriptszintek kiértékelését a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszer segítségével végeztük (Livak és Schmittgen 2001). Szignifikáns eredményként azon értékeket vettük figyelembe, melyek legalább kétszeres különbséget mutattak a kiválasztott kontrollhoz képest, ami többnyire a kísérlet kezdeti kontrollmintája volt.

1. táblázat. Az RT-qPCR-hez használt gén-, illetve géncsoport-specifikus primerek szekvenciája

Gén*/ géncsoport	Forward szekvencia	Reverse szekvencia
18S rRNS	5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3'	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'
P5CS	5'-CGAGGGAGTGGACAAGTAGTGAAC-3'	5'-AGGGGGCTTTGAAGAGGATTATT-3'
TaGSTU2	5'-CACCGTGCTCGCTTGGAT-3'	5'-CGGACTCAGACACACACAAACA-3'
cAPX I	5'-CCTTCTTCAGTTGCCGACC-3'	5'-TCAGCAAAGAACGCATCCTC-3'
cAPX II	5'-AGGAGAGGTCTGGCTTTGAG-3'	5'-GTCAGCAGGGTTTTGTCACTT-3'
tAPX	5'-GCCGAAGCCCATGCTAAACT-3'	5'-ATCACTCGCTGGTGCTGGAT-3'
sAPX I	5'-GCAGCTGCTGAAGGAGAAGTC-3'	5'-CAATTTCAAACCTCAAGCTACCAT-3'
sAPX II	5'-GGCGATCGGTGAGGTGC-3'	5'-TGGGGTGGCAGTGGGTT-3'
mAPX	5'-CTACTGATAAGGCATTGTTGGAT-3'	5'-TGATCCGTGGTGTGAAGC-3'
cMDAR I	5'-CGATGAAGATCTACAACGACGAGA-3'	5'-CCGCCTCTTTCCCCTTGAT-3'
cMDAR II	5'-CGAGCAGGCAGTAAAGGCG-3'	5'-TCCCCGAACAGCACCGT-3'
chlMDAR	5'-AGTATGAAGGAAGCTCCAGGAAAAT-3'	5'-AAACACCCTTCAATCGACTATCAGA-3'
mMDAR	5'-GGACGACTACGAGGCGTTAT-3'	5'-AGGCACGTCTTTCTTGCTTT-3'
cDHAR	5'-GCCTGTGTATAACGGTGGTG-3'	5'-CGTGACAAAGGTGGAGAAGA-3'
chlDHAR	5'-AATTGGTCTGTCCCAGATGC-3'	5'-TCCAGCAATGACATCCTCTG-3'

1. táblázat. Folytatás

Gén*/ géncsoport	Forward szekvencia	Reverse szekvencia
cGR	5'-ATCCTTGGTGGTTCTGGTGT-3'	5'-CTTGGTCGTGTGCCTTTG-3'
chlGR	5'-TTGGGCTGTTGGAGATGTTA-3'	5'-CTCTGGTTTGGTCGGTTCAT-3'
TA54762	5'-GGCTCGGCAACAGTCC-3'	5'-CAGTATGGTCAGCAAGAGACAGA-3'
TA69106	5'-CCTCGGCAACAAGGTGA-3'	5'-TGTCAAAATCCACAAGAACTCC-3'
TA66711	5'-GGACAGCCTTGCCACCT-3'	5'-GCCTCCAGCACCTGA-3'
TA94922	5'-CGGCGTGCGAGGTAG-3'	5'-CGACGACAACGGAGATGTT-3'

* A TA-k esetében az egyedi számazonosító után a taxon-azonosító szerepel: 4565.

5.5. Élettani mérések

5.5.1. Relatív víztartalom meghatározása

A levelek relatív víztartalmát a következő egyenlet alapján számoltuk ki $100 \times (FT - SZT) / (TT - SZT)$, ahol FT a friss tömeg; TT a turgid tömeg, melyet 24 órán át, 4°C-on, sötétben történő vízben áztatás után kapunk meg; SZT pedig a 24 órás, 80°C-on való szárítás utáni száraz tömeg.

5.5.2. Relatív prolintartalom meghatározása

A szabad prolintartalmat Bates (1973) módszere alapján mértük. 50-100 mg lefagyasztott levelet dörzsöltünk el 3%-os vizes szulfoszalicilsavban (5 µl oldat/mg levél); centrifugálás (10000 rpm, 10 perc) után savas ninhidrin (0.14 M ninhidrin, 60v/v% ecetsav, 40v/v% 6M foszforsav) és tömény ecetsav elegyében (200-200 µl) tettük át a felülúszót, majd 1 órára 90°C-os vízfürdőbe raktuk. Az egy óra letelte után a mintákat 10 percig jégen tartottuk a reakció leállítása végett, majd ezt követte az extrakció 1ml toluollal. Erőteljes keverés után a toluolos fázist vittük tovább, amely a prolin ninhidrinnel alkotott színes derivatívjának következtében sárga színű lett. A színintenzitás egyenesen arányos a mintában található prolin mennyiségével. Az abszorbanciamérést kvarc küvettában végeztük 520 nm-nél spektrofotométerrel (Shimadzu UV-160), vakreakcióval szemben nullázva. Mivel elsősorban a stresszelt növények kontrollhoz viszonyított prolintartalma érdekelt bennünket, ezért az egyes értékeket a kontroll növényekben mért abszorbancia %-ában adtuk meg, ehhez a kalibrációs egyenlessel történő abszolút

prolinkoncentráció meghatározása nem volt szükséges. A méréseket hat ismételtsben végeztük.

5.5.3. Klorofill- és karotinoidtartalom meghatározása

A méréshez ~ 25 mg friss levelet használtunk, melyet jéghideg 2 ml-nyi 80v/v%-os acetonnal dörzsöltünk el. Ezt követően 10 percnnyi centrifugálás (7500 rpm) következett, majd a mintákat spektrofotometriásan (Shimadzu UV-160) mértük 80v/v%-os aceton ellenében a következő hullámhosszokon: 470 nm (karotinoidok), 646.8 és 663.2 nm (klorofill *a* és *b*). A méréseket hat ismételtsben végeztük. A számításokhoz az alábbi képleteket használtuk:

$$\text{Klorofill } a: 12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8}$$

$$\text{Klorofill } b: 21.5 \times A_{646.8} - 5.1 \times A_{663.2}$$

$$\text{Klorofill } a+b: 7.15 \times A_{663.2} + 18.71 \times A_{646.8}$$

$$\text{Karotinoidok: } 1000 \times A_{470} - 1.82 \times \text{klorofill } a - 85.02 \times \text{klorofill } b / 198$$

A kapott eredményeket µg/mg friss tömegben adtuk meg.

5.5.4. Gázcsere-vizsgálatok

A CO₂-gázcsere mérése a növények második levelén zajlott nyitott rendszerű LI-6400 típusú infravörös gázanalizátor (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) felhasználásával. A külső levegőt tisztítva kaptuk meg a referencia CO₂-koncentrációt, ami esetünkben 400 µmol m⁻² s⁻¹ volt 300 µmol m⁻² s⁻¹ beállított áramlási sebességgel. A levegő relatív páratartalma 30-50%, a kamra belső hőmérséklete pedig 21-23°C volt. A mérések során 6 cm² levélfelületet vizsgáltunk (ezt három levél egyidejű behelyezésével értük el), amelyet KL-1500 típusú lámpával (Schott, Mainz, Germany) világítottunk meg 100-2000 mmol m⁻² s⁻¹ PAR értékeket lépésenként alkalmazva. Az egyes mérések alkalmával hét mért, illetve számolt adatot rögzítettünk, mindezt fajtánként és mintánként 3-3 ismételtsben. Az egyes paraméterek közül négy, fontos jellemzőt emeltünk ki: a nettó CO₂-asszimiláció (fotoszintetikus ráta; *A*), a transzspirációs ráta (*E*), a sztómakonduktancia (*g_s*), valamint az *A/g_s* hányadosból kapott vízhasznosítási hatékonyság (WUE) értékét.

5.5.5. ABS-tartalom meghatározása

Az ABS-tartalom meghatározását Yang és mtsai (2003) szerint végeztük. 100-400 mg gyökérmintát dörzsöltünk el 2.5 ml 80v/v% metanolt tartalmazó extrakciós pufferben. Feltárás után a minták TBS-pufferben lettek visszaoldva (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 3 mM imidazol, pH 7.5) (1500 μL /100 mg minta). Magát az ABS-tartalmat ELISA technikával határoztuk meg, amelyhez Phytodetek Assay Kitet (Idetek, Sigma Ltd.) használtunk. A szubsztráttal való reakciót követő elszíneződés mértékét 405 nm-en határoztuk meg, ehhez plate-olvasót használtunk (Dynatech MR4000, Dynatech Laboratories, USA). A méréseket három ismétlésben végeztük.

5.6. Statisztika

A disszertációban szereplő adatok átlagértékek 3-6 ismétlésből (az ismétlésszám külön-külön megadva az egyes méréseknél az Anyag és módszer fejezetben) kiegészítve a szórás értékekkel (standard deviáció - SD). Méréseink során többnyire t -tesztet (Student's t test) alkalmaztunk, valamint a funkcionális eloszlás meghatározásánál a χ^2 -próbát használtuk Yates korrekciójával a szignifikanciaszint meghatározására. Szignifikánsnak azon értékeket vettük, ahol $P < 0.05$.

6. Eredmények

6.1. Két, szárazságstresszre toleráns búzafajta összehasonlítása hosszú távú, mérsékelt vízhiány során

Ebben a kísérletben két, szárazságra toleráns búzafajtát hasonlítottunk össze. Előzetes ismereteink alapján – mely szerint a Plainsman V egy adaptív, míg a Kobomugi tájfajta egy menekülő stratégiát folytat – az érdekelt bennünket, hogy a két, feltételezetten különböző alkalmazkodási folyamat hogyan valósul meg a gyökerekben, milyen gének kifejeződése változik meg szárazságstressz hatására.

6.1.1. Növekedési paraméterek

Az öntözőoldat mennyiségének csökkentésével párhuzamosan a növények hajtásának és gyökerének friss tömege egyaránt csökkenést mutatott a kísérlet negyedik hetére a kontroll körülmények között nevelt növényekéhez viszonyítva (2. táblázat).

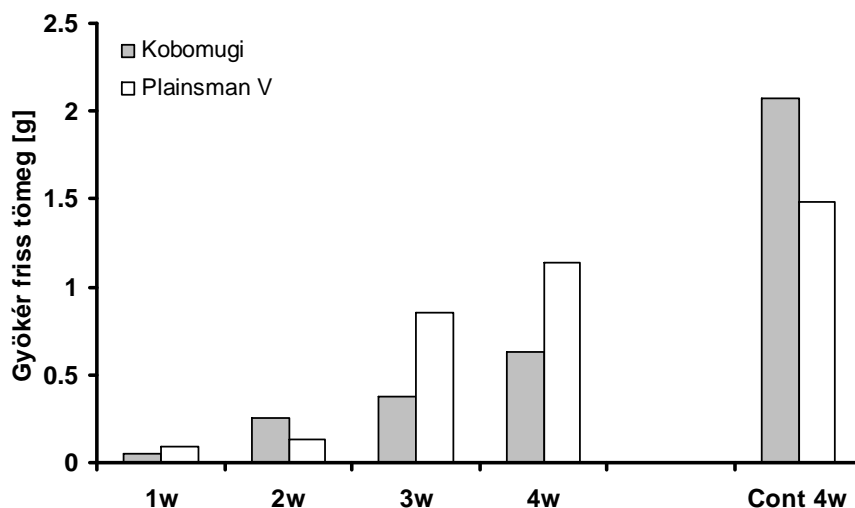
2. táblázat. Plainsman V és Kobomugi növények hajtás-, illetve gyökértömegének változása vízmegvonás hatására

Minták	Hajtás friss tömeg [g]		Gyökér friss tömeg [g]	
	<i>Plainsman V</i>	<i>Kobomugi</i>	<i>Plainsman V</i>	<i>Kobomugi</i>
Cont	0.233 ± 0.056	0.301 ± 0.026	0.137	0.143
1w	0.387 ± 0.091	0.421 ± 0.057	0.232	0.189
2w	0.612 ± 0.237	0.989 ± 0.088	0.270	0.399
3w	0.818 ± 0.211	0.893 ± 0.097	0.988	0.515
4w	0.950 ± 0.323 ***	1.036 ± 0.084 ***	1.279 (-21%)	0.769 (-65%)
Cont4w	1.694 ± 0.272	1.644 ± 0.064	1.621	2.217

*** $P < 0.001$

A gyökerek esetében elmaradt statisztika oka a tizenöt növény gyökérzetének összekuszálódása, melyeket nem szedtünk szét a mechanikai sérülés elkerülése végett. A feltüntetett adatok az összgyökérzet 1/15 részét képviselik, azaz egy átlagos gyökérre vonatkoznak. Még a statisztikai adatok hiányában is levonható a következtetés, hogy a Kobomugi növények gyökérnövekedésének szárazságstresszre bekövetkező csökkenése jóval intenzívebb volt (65%), mint a Plainsman V növények esetében (21%).

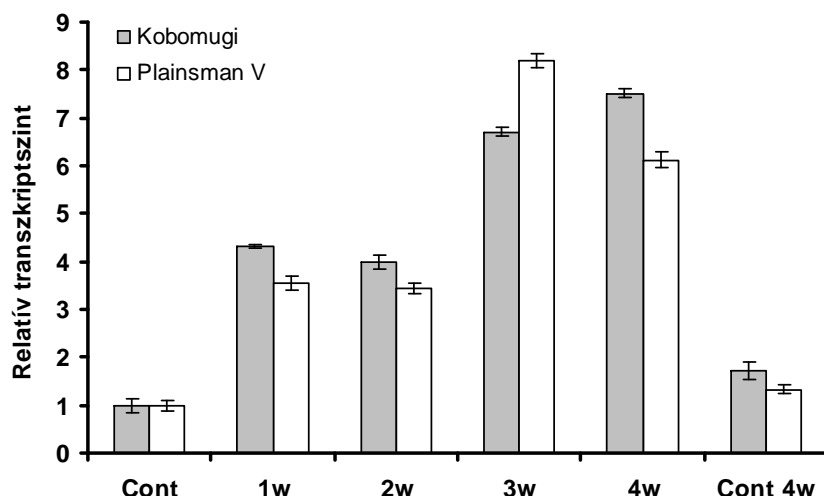
A tömegadatok csökkenése egyöntetűen bizonyítja a vizsgált növények stresszelt állapotát. A két fajta közötti, eltérő gyökérfejlődést a növekedés intenzitása is jól szemlélteti (4. ábra) - a mérsékelt vízhiány hatására a Kobomugi gyökérnövekedése közel lineáris trendet mutatott, míg a Plainsman V esetében egy fokozódó, talán szigmoid görbe rajzolódott ki. Egy pontos növekedési trend felállításához gyakoribb mintavételre lenne szükség.



4. ábra. A gyökérnövekedés mértéke szárazságstressz során. Az y tengely az abszolút növekedési értékeket jelöli: adott időpontban mért gyökértömegből kivontuk a kiindulási tömegértéket. A stresszelt növényeket az 1w-4w tengelyfeliratok jelölik, a negyedik hetes kontroll növényeket a Cont 4w.

6.1.2. A *P5CS* gén mint szárazságstressz-indikátor kifejeződésének nyomon követése

A *P5CS* gént a szárazságstressz létrejöttének molekuláris nyomon követésére választottuk, mivel jelentős szerepe van a szárazságra kialakuló válaszban. Kulcsenzime a prolin-bioszintézisnek, melynek eredménye a megnövekedett prolinszint, amely mint ozmotikum vesz részt a stressz kivédésében. A *P5CS* gén kifejeződése mindkét fajta esetében növekedett a kísérlet folyamán – a Plainsman V növények gyökerében a csökkentett öntözés harmadik, míg a Kobomugi egyedeknél a negyedik hetében mutatott transzkriptszint maximumot (8-, illetve 7-szeres indukció) (5. ábra). Ezen eredmények, továbbá a tömegadatok ismeretében elfogadtuk, hogy az általunk alkalmazott, csökkentett vízmennyiséggel való öntözés valóban sejt- és fejlődési szintű stresszválaszra kényszerítette növényeinket. Ennek tudatában folytattuk további vizsgálatainkat.



5. ábra. A *P5CS* génkifejeződése gyökérben szárazságstressz hatására. A RT-qPCR adatokat kétszer normalizáltuk: egyszer a 18S rRNS kifejeződési szintjéhez, valamint a kezdeti minta transzkript-mennyiségéhez.

6.1.3. Gének kifejeződésének vizsgálata árpa cDNS-macroarray-vel

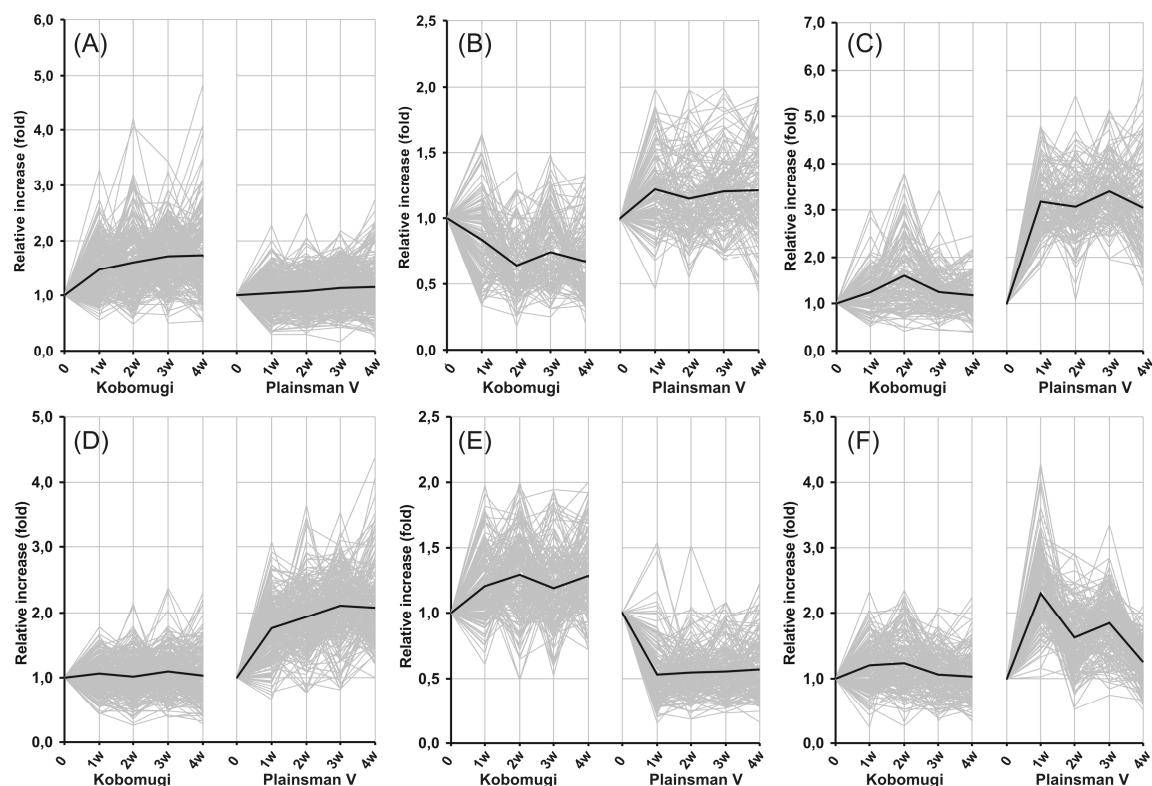
Bennünket elsősorban a gyökerekben történő génkifejeződés-változás érdekelt, választásunkat a két fajta közötti, különböző ütemű gyökérnövekedés, valamint a fajták közötti, eltérő gyökérmorfológia indokolta (Sečenji és mtsai 2010b). Így a macroarray-hez jelölt, gyökérmintából (Cont, 1w, 2w, 3w 4w, Cont 4w) kivont RNS-ekből szintetizált cDNS-eket hibridizáltattunk. A továbbiakban - egyszerűsítésként - a „cDNS-próba által detektált transzkript” kifejezés helyett géntkifejeződést használunk. Természetesen tisztában vagyunk a ténnyel, hogy az array-n lévő árpa cDNS-próbához több búza cDNS is kötődhet, így a konkrét gén nem azonosítható. A kiértékelésnél minden olyan gént figyelembe vettünk, amelynek kifejeződése legalább kétszeresére növekedett, vagy a felére csökkent bármelyik stresszelt minta esetében. Összesített eredményként a következő számadatokat kaptuk. A 10450 egyedi cDNS-próba közül összesen 773 (7.4%) mutatott kétszeresnél nagyobb növekedést a Plainsman V növények gyökerében, a Kobomugi növényeknél ez a szám 448 (4.7%) volt. Azon gének száma, melyek kifejeződésének mértéke legalább a felére csökkent a stressz hatására (represszálódott), a Plainsman V növényeknél 879 (8.4%), míg a Kobomugi esetében 507 (4.9%) volt. Megkerestük azokat a géneket is, amelyek mindkét fajtában közösen indukálódtak (207 – 2%) vagy represszálódottak (205 – 2%). Ezzel elmondhatjuk, hogy az általunk alkalmazott szárazságstressz az array-n található gének 21%-ának kifejeződését változtatta meg

legalább kétszeres mértékben. Ezen gének többsége a csökkentett öntözés első két hetében indukálódott, illetve represszálódott, valamint a számuk kétszer több volt Plainsman V gyökerekben, mint a Kobomugi növényeknél. Ez a fajta közötti különbség kiegyenlítődött a harmadik, illetve negyedik hétre. Találtunk öt olyan gént is, amelyek kifejeződése egyaránt mutatott növekedést, illetve csökkenést is a négyhetes stressz folyamán. Ezek közül négy a Kobomugi fajtánál fordult elő: három gén (HV03K15 – peroxidáz; HO06E15 – szárazság-indukált, hidrofób fehérje; HO05M18 – ismeretlen funkciójú fehérje) a második héten indukálódott, a harmadik héten pedig represszálódott, egy gén (HM02G17 – ismeretlen funkciójú fehérje) viszont a harmadik, illetve a negyedik héten mutatta ugyanezt az irányultságú kifejeződést. Ezzel szemben a Plainsman V növények gyökerében kimutatott gén (HX04D19 – ismeretlen funkciójú fehérje) az első héten indukálódott, és a negyedik hétre esett vissza jelentősen a transzkripszintje az általunk alkalmazott aszálystressz hatására.

A továbbiakban megnéztük, hogy milyen kifejeződés-mintázatot mutattak az indukált, valamint represszált gének.

6.1.3.1. Klaszteranalízis – hasonló kifejeződés-mintázatú gének csoportosítása

A 6. ábra összesíti azt a hat klasztert, melyek a jellegzetes kifejeződés-mintázatot mutató géneket hozták össze egy-egy csoportba. Találunk közöttük olyan csoportokat, melyek génjei csak a Kobomugi növények gyökereiben indukálódtak (6A. ábra) vagy represszálódtak (6B. ábra), illetve amelyek tagjai csak a Plainsman V egyedek gyökereiben mutattak megnövekedett (6D. ábra) vagy lecsökkent (6E. ábra) kifejeződést a visszaszorított öntözés hatására. Olyan klaszterek is formálódtak, melyekben a gének átmeneti kifejeződés-növekedést produkáltak: a Plainsman V növényeknél a szárazságstressz első hetében (6F. ábra), valamint a Kobomugi egyedek gyökerében a második héten (6C. ábra) jelentkezett ilyen jellegű változás. Az utóbbi csoport génjei (6C. ábra) emellett tartósan magas transzkripszinten fejeződtek ki a Plainsman V növények gyökerében, ami különösen felkeltette az érdeklődésünket. Ezeket a jelölteket a 3. táblázat foglalja össze.



6. ábra. Különböző kifejeződés-mintázatú gének csoportosítása klaszterekbe. A klaszterezés során azonos csoportba kerültek azok a gének, melyek csak a Kobomugi növények gyökerében indukálódtak (A), illetve represszálódtak (B); átmeneti indukciót mutattak a Kobomugiban (C); csak a Plainsman V növények gyökerében indukálódtak (D), illetve represszálódtak (E); átmeneti indukciót mutattak a Plainsman V (F) növények esetében. A kiemelt vonalak az átlagolt, relatív változás értékeit jelölik.

3. táblázat. A Plainsman V növények gyökereiben tartósan megnövekedett, míg a Kobomugi gyökerekben átmeneti indukciót mutató gének. A táblázatba csak azon gének kerültek, melyek mind búzában, mind árpaiban ugyanazt a funkciójú fehérjét kódolják annotációjuk szerint.

Egyedi azonosító búza*/árpa (nukleinsav- szekvencia hasonlósága %- ban)	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke **							
		Plainsman V				Kobomugi			
		1w	2w	3w	4w	1w	2w	3w	4w
TA50524/ HT01L20 (97%)	Feltételezett transzkripciót szabályozó fehérje SNF5	2.1	2.0	2.5	2.5	1.0	2.0	-1.1	1.5
TA73247 / HU01M19 (83%)	Transzkripció iniciációs faktor TFIID-2	1.9	2.3	2.4	2.6	1.0	3.2	1.0	1.3
TA56804 / HU01M06 (97%)	Feltételezett TBP-kötő fehérje	3.0	7.0	7.6	5.8	1.1	2.8	1.2	-1.1
TA59888 / HT01B22 (94%)	Cyc07	3.9	5.7	5.6	3.7	1.2	3.6	1.4	1.4

3. táblázat. Folytatás.

Egyedi azonosító búza*/árpa (nukleinsav- szekvencia hasonlósága %- ban)	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke **							
		Plainsman V				Kobomugi			
		1w	2w	3w	4w	1w	2w	3w	4w
TA64008 / HA11K09 (86%)	Hiszton H2B	6.5	6.4	9.5	5.9	1.5	3.3	1.1	1.5
TA54387 / HT01G24 (97%)	Feltételezett RNS-kötő fehérje RBP37	2.8	2.9	2.8	3.0	1.1	2.0	1.2	1.0
TA63430 / HU01M05 (94%)	Riboszómális fehérje L3	4.1	4.6	4.5	4.5	1.3	2.7	1.6	1.8
TA59533 / HY09D08 (93%)	ADP-ribosilációs faktor	4.0	4.3	4.1	3.8	1.0	2.8	-1.4	-1.1
TA91761 / HO15I16 (78%)	Feltételezett fehérje-kináz	4.5	2.9	3.3	3.8	1.2	3.6	1.3	-1.1
TA55387 / HW01G04 (89%)	TPA: feltételezett cisztein- proteáz	2.7	2.5	2.9	4.7	1.0	2.7	1.7	1.6
TA78550 / HO10B23 (97%)	Guanilát-kináz	4.6	3.7	3.5	2.0	1.5	3.0	-1.3	-1.1
TA65733 / HV01D04 (82%)	GDP-disszociáció inhibitor fehérje	3.7	3.1	3.7	4.0	1.2	2.1	1.3	1.6
TA65940 / HT01L08 (93%)	Feltételezett proteasóma szabályozó, nem ATPáz alegysége	2.3	2.7	2.8	2.0	1.2	2.6	1.3	1.6
TA66073 / HT01I17 (91%)	20S proteasóma béta 5 alegysége	2.3	2.8	2.9	2.7	1.4	2.7	1.4	1.8
TA65185 / HU02C15 (98%)	Feltételezett klatrin nehéz lánc	2.9	2.6	2.2	2.0	1.6	2.0	1.3	1.8
TA108252 / HW06D15 (95%)	Aminósav-permeáz	2.0	2.2	2.6	1.3	1.8	2.4	-1.1	1.7
TA50368 / HU01I12 (94%)	Külső mitokondriális membránfehérje porin	1.9	2.0	3.3	2.4	1.3	2.1	1.8	1.6
TA63024 / HT01B20 (93%)	Plazmamembrán H ⁺ -ATPáz	5.3	5.6	5.9	6.4	1.2	2.8	1.6	1.5
TA82604 / HA06N05 (96%)	P-típusú ATPáz	2.1	2.5	2.2	1.4	1.1	2.1	-1.1	1.2
TA56750 / HU01E24 (92%)	Feltételezett Hsp70	2.2	2.3	2.2	1.9	1.0	3.1	1.2	1.4
TA71800 / HO02C06 (94%)	Betainaldehid-dehidrogenáz	2.6	2.9	3.5	3.1	1.0	2.4	1.7	1.7
TA70845 / HU01I20 (94%)	Porfobilinogén-deamináz	2.7	2.7	3.1	2.4	1.0	2.5	1.4	1.4
TA71082 / HV01P14 (95%)	Feltételezett foszfoetanolamin- N-metiltranszferáz	2.2	2.5	3.0	2.3	1.1	3.5	1.4	1.2
TA79082 / HT01P21 (94%)	Argininoszukcinát-liáz	2.3	3.7	2.8	3.9	1.3	2.5	1.1	1.2

3. táblázat. Folytatás.

Egyedi azonosító búza*/árpa (nukleinsav- szekvencia hasonlósága %- ban)	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke **							
		Plainsman V				Kobomugi			
		1w	2w	3w	4w	1w	2w	3w	4w
TA51258 / HT01P18 (93%)	Feltételezett szuperoxid- diszmutáz	2.8	2.7	2.9	3.2	1.1	3.1	1.3	1.8
TA77948 / HA06M17 (92%)	Feltételezett peroxidáz	2.9	2.1	3.1	1.7	1.4	2.7	1.4	1.6
TA63975 / HT01F03 (95%)	Aszkorbát-peroxidáz	2.2	2.1	2.3	1.9	1.2	2.2	1.5	1.2
TA65440 / HT01F04 (86%)	Peroxiredoxin	3.4	3.2	4.4	4.7	1.6	2.3	1.6	1.4
TA67031 / HA08C17 (92%)	Tioredoxin-családba tartozó fehérje	3.6	2.1	3.6	2.3	1.2	2.2	1.4	1.4
TA57631 / HT01N07 (94%)	Xilóz-izomeráz	2.1	2.8	2.9	2.0	1.1	3.1	-1.1	1.4
CD879996 / HW08J03 (94%)	β-glükozidáz	3.3	2.3	3.5	2.9	-1.3	2.0	-1.1	1.3
TA74449 / HB09F20 (88%)	β-glükozidáz izozim 2 prekurzora	4.1	4.1	3.9	4.0	1.6	2.7	1.5	1.1
TA60117 / HO10J17 (97%)	Glükóz-6-foszfát- dehidrogenáz	3.0	3.0	2.9	2.2	1.4	2.1	1.5	1.1
BJ236472 / HY08P07 (77%)	α-amiláz inhibitor prekurzora	3.2	3.7	3.4	3.7	1.5	3.0	1.1	1.0

* A búza TA-k esetében az egyedi számazonosító után a taxon-azonosító szerepel: 4565.

** A ≥ 2 mértékű változásokat félkövér számokkal emeltük ki.

Látható, hogy változatos funkciójú fehérjéket kódolnak – többek között transzkripció-szabályozás, fehérjemódosítás, membránfunkció, jelátvitel, detoxifikáció, szénhidrát-anyagcsere szerepel a felsorolt gének működési területeként.

6.1.3.2. Az indukált gének funkció szerinti csoportosítása

A gének funkció szerinti csoportosításához a génontológiát (GO) vettük alapul. Ehhez a Lange és mtsai (2007) által leírt annotációt használtuk. Ezt az utat követve jutottunk el az eredményhez, miszerint a Kobomugi növények gyökereiben szignifikánsan magasabb ($P < 0.05$) arányban indukálódtak a cisztein-típusú proteázok (Függelék, 1. táblázat), a Plainsman V növényeknél viszont azon gének fordultak elő nagyobb

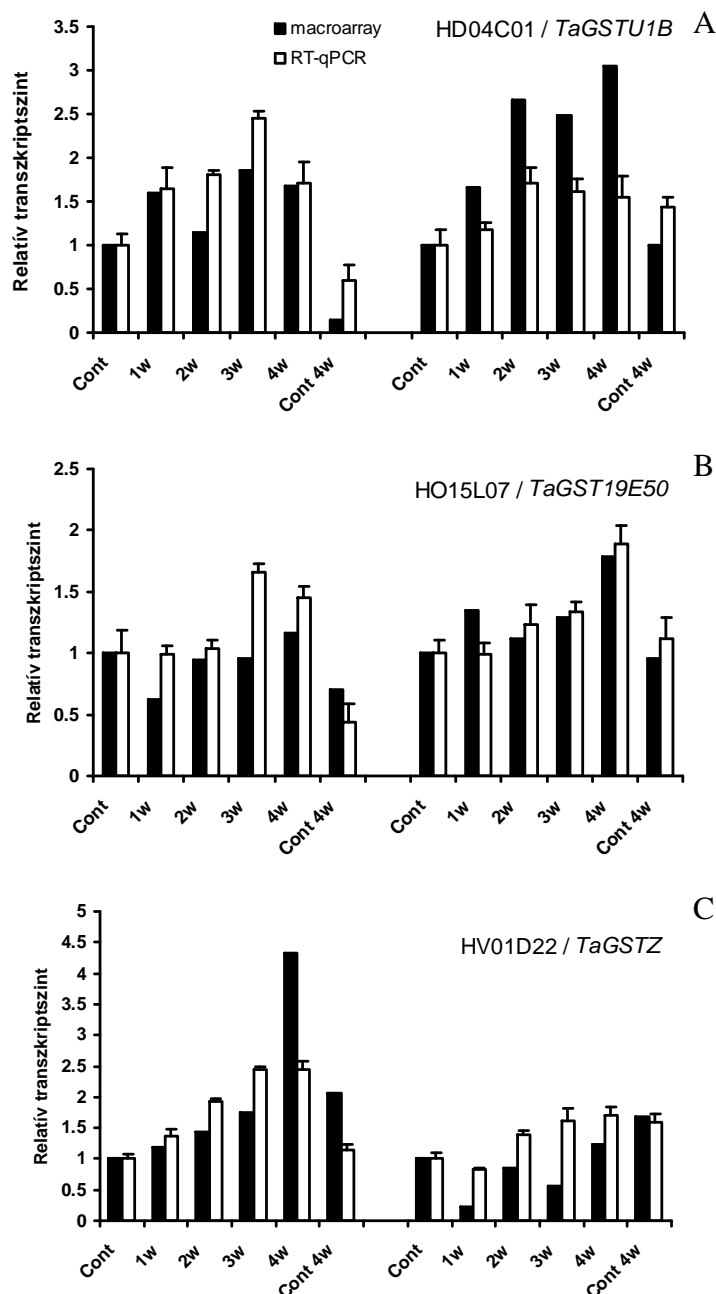
számban, amelyek oxidoreduktázokat kódolnak (Függelék, 2. táblázat). Ilyenek a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, a 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz, a malát-dehidrogenáz, az izocitrát-dehidrogenáz, az alkohol-dehidrogenáz és az UDP-glükóz-dehidrogenáz. Ezen enzimek közös tulajdonsága, hogy a CH-OH csoporton hatnak, és elektronakceptorként NAD-ot vagy NADP-ot használnak. A Kobomugihoz hasonlóan ennél a fajtánál is találtunk még cisztein-típusú proteázokat az indukciót mutató gének csoportjában, de kisebb arányban, valamint sejtfallal kapcsolatos fehérjéket kódoló géneket is (Függelék, 3. táblázat).

A GO terminológia szerinti mechanikus besorolás mellett a géneket annotációjuk alapján egyedi mérlegeléssel is osztályoztuk a szakirodalomból ismert, stressz- és védekezés-specifikus, valamint a sejtszerveződésben, illetve sejtfal-biogenezisben való lehetséges részvételük szerint. Ezen megközelítésnél is hasonló eredményt kaptunk, mint a GO vizsgálatnál: a stressz- és védekezés-specifikus gének esetében a proteázok domináltak a Kobomugi gyökerekben ($P < 0.001$; Függelék, 1. táblázat), a Plainsman V növényeknél pedig a proteázokat kódoló gének mellett ($P < 0.01$; Függelék, 1. táblázat) a peroxidázokat ($P < 0.01$; Függelék, 4. táblázat) kódolók is nagy számban jelentkeztek. Ami a sejtszerveződésben, illetve sejtfal-biogenezisben résztvevő géneket illeti, csak a Plainsman V növények esetében találtunk ilyeneket jelentős mennyiségben – xiloglükán-endotranszzglükozilázokat (XET; $P < 0.001$), expanszinokat ($P < 0.01$), valamint hidroxiprolinban gazdag glükoproteineket ($P < 0.01$) kódoló géneket (Függelék, 3. táblázat).

6.1.3.3. A macroarray-eredmények validálása valós idejű, kvantitatív RT-PCR-rel: a glutation-transzferáz géncsalád

A macroarray-eredmények validálását SYBR Green alapú, valós idejű RT-qPCR-rel végeztük. Ehhez a glutation-transzferáz géncsalád néhány tagját helyeztük a figyelem középpontjába: *TaGSTU1B* a tau-, *TaGST19E50* a phi- és *TaGSTZ* a zeta-csoportból. Ezen kívül még két családtagot vizsgáltunk, melyek nem szerepeltek az array-n: *TaGSTU2* a tau- és *TaGSTF6* a phi-csoportból. Az utóbbi GST-eket Gallé és mtsai (2009) eredményei alapján vontuk vizsgálatba, hogy e növény-specifikus csoportok (tau és phi) további két tagját is összehasonlíthassuk az előző három gén transzkriptszintű viselkedésével. Az array-n szereplő *TaGSTU1B*, *TaGST19E50* és *TaGSTZ* kifejeződése mindkét mérési technikával hasonló időrendbeli lefutást mutatott, de a regressziós analízis

eredményéből ($R^2 = 0.369$ 30 pontra számolva) kiindulva elmondhatjuk, hogy a relatív transzkript-mennyiségek értéke jelentősen különbözött (7. ábra). Ez magyarázható i) a heterológ rendszerrel, ii) a cDNS-array-k nagyobb szekvenciabeli szabadságával (már 80%-nyi hasonlóság elég a sikeres hibridizációhoz), valamint iii) a két technika eltérő érzékenységeivel. Jól látható, hogy a *TaGSTU1B* és a *TaGSTZ* kifejeződése szignifikánsan megnőtt a Kobomugi gyökereiben a szárazságstressz harmadik hetében, viszont a phi-csoportú *TaGST19E50* nem mutatott semmilyen változást a kísérletünk során.

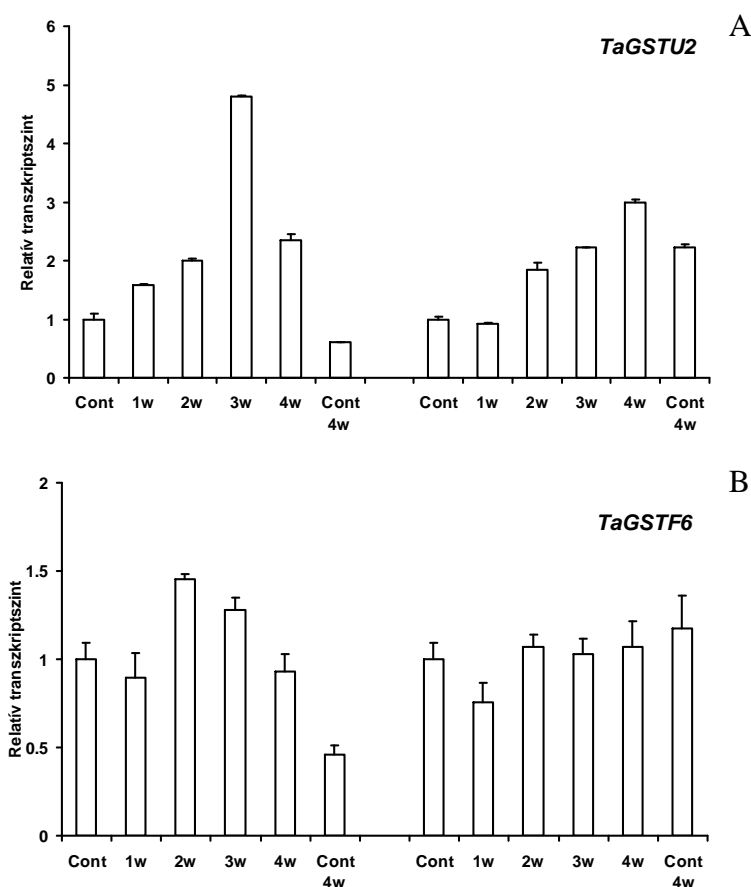


7. ábra. A macroarray-adatok validálása valós idejű RT-qPCR-rel: tau-, phi- és zeta-csoportból való GST-k relatív transzkriptszintjei.

A RT-qPCR adatokat kétszer normalizáltuk: egyszer a 18S rRNS kifejeződési szintjéhez, valamint a kezdeti minta transzkript-mennyiségéhez.

A *TaGSTU1B* (A), a *TaGST19E50* (B) és a *TaGSTZ* (C) a legközelebbi homológjai az array-n található árpaEST-knek: HD04C01 (A), HO15L07 (B) és HV01D22 (C). Az ábra bal oldalán a Kobomugi, a jobb oldalán pedig a Plainsman V látható.

A másik két GST vizsgálatokor azt kaptuk, hogy míg a *TaGSTU2* kifejeződésszintje megnőtt mind a Kobomugi (harmadik hét), mind a Plainsman V (negyedik hét) gyökerekben, addig – a *TaGSTI9E50*-hez hasonlóan – a *TaGSTF6* transzkripszintje változatlan maradt mindkét fajta esetében (8. ábra).



8. ábra. A macroarray-n nem szereplő *TaGSTU2* (A) és *TaGSTF6* (B) kifejeződésének vizsgálata szárazságstressz során. A RT-qPCR adatokat kétszer normalizáltuk: egyszer a 18S rRNS kifejeződési szintjéhez, valamint a kezdeti minta transzkript-mennyiségéhez. Az ábra bal oldalán a Kobomugi, a jobb oldalán pedig a Plainsman V látható.

6.2. Stressztoleranciájukban eltérő jellegű búzafajták összehasonlítása korlátozott vízellátás során

Ezzel a kísérlettel az általunk tervezett, a természetben előforduló kiszáradási körülményekhez hasonlító, optimalizált nevelési rendszert vettük górcső alá. Az előzőekben leírt perlites rendszertől abban különbözik, hogy i) a keverék kétharmad rész homokot tartalmaz – a búzanövények jobban fejlődtek ebben a talajkeverékben; ii) meghatározott tömegre locsoltuk vissza az egyes cserepeket, így biztosítva a kívánt talajvíztartalmat; iii) az öntözést szivárgó csövön keresztül végeztük, így a talaj ténylegesen csak a cserép alján volt nedves (a természetben előforduló, folyamatos

kiszáradást utánoztuk így). Két, szárazságra toleráns, valamint két, szárazságra érzékeny búzafajtán teszteltük a rendszert (9. ábra).



9. ábra. Plainsman V (A), Cappelle Desprez (B), Xiaoyan-54 (C), Jing-411 (D) növények a négyhetes vízhiányt követően (40% FC), illetve kontroll körülmények között nevelve (80% FC).

A kísérlet során nyomon követtük a hajtások és gyökerek tömegét, illetve hosszát, szélességét; a levelek relatív víztartalmát; az ABS-tartalom gyökérbeli változását; a

fotoszintézist a CO₂-asszimiláció, valamint a klorofilltartalom meghatározásával. Mindezen eredményekből információt kaptunk azon növények állapotáról, amelyek fokozatosan kiszáradó talajon nőttek két héten át (négyhetes növények), illetve további két héten keresztül alacsony (40% FC) víztartalmon tartott talajban nevelkedtek (hathetes növények). A kísérlet végső célja a növények e körülményekre adott válaszainak molekuláris feltérképezése volt, az általunk tervezett oligonukleotid-microarray felhasználásával.

6.2.1. Növekedési paraméterek

A növekedési paramétereket az 4. és a 5. táblázatban foglaltuk össze. A feltüntetett adatokból kitűnik, hogy a kéthetes stresszt követően három fajta esetében szignifikánsan csökkent hol a levél hossza (Cappelle Desprez, Jing-411, Xiaoyan-54), illetve szélessége (Cappelle Desprez, Jing-411), hol a hajtás friss (Xiaoyan-54, Jing-411), valamint száraz tömege (Xiaoyan-54, Jing-411). A Plainsman V fajta esetében is mértünk csökkenéseket e paraméterek esetében, viszont ez a változás nem volt statisztikailag szignifikáns.

4. táblázat. Négyhetes búzanövények hajtás- és gyökérnövekedési adatai kéthetes aszálystresszt követően (40% FC), valamint kontroll körülmények között (80% FC). A gyökér/hajtás arányt a száraz tömegekből számoltuk ki.

Fajta	Relatív FC	Levélhossz ± SD [cm]	Levél-szélesség ± SD [mm]	Gyökér FT ± SD [g]	Hajtás FT ± SD [g]	Gyökér SZT ± SD [g]	Hajtás SZT ± SD [g]	Gyökér /hajtás arány
<i>Plainsman V</i>	80%	22.08 ± 2.44	4.50 ± 0.49	1.26 ± 0.13	1.07 ± 0.39	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.75
	40%	21.95 ± 2.44	4.42 ± 0.45	1.20 ± 0.02	0.75 ± 0.24	0.11 ± 0.00	0.10 ± 0.03	1.10
<i>Cappelle Desprez</i>	80%	27.73 ± 1.07	5.33 ± 0.52	1.18 ± 0.09	0.92 ± 0.41	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.05	0.75
	40%	17.82 ± 3.20 ***	3.80 ± 0.55 ***	1.10 ± 0.09	0.59 ± 0.21	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.04	1.18
<i>Xiaoyan-54</i>	80%	19.58 ± 0.97	4.55 ± 0.39	1.17 ± 0.02	0.67 ± 0.17	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.02	1.00
	40%	14.97 ± 0.82 ***	4.08 ± 0.38	0.94 ± 0.16	0.29 ± 0.12 *	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02 ***	1.80
<i>Jing-411</i>	80%	17.60 ± 1.17	4.90 ± 0.35	1.04 ± 0.07	0.52 ± 0.09	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	1.13
	40%	13.22 ± 1.21 ***	3.38 ± 0.32 ***	0.79 ± 0.15	0.30 ± 0.10 *	0.10 ± 0.02	0.05 ± 0.02 ***	2.00

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

Ami a gyökérben történő változásokat illeti, mind a négy fajta esetében csökkent mértékű gyökérnövekedést tapasztaltunk, bár a mértéke kisebb volt, mint a föld feletti részeknél. Ebből adódóan a gyökér/hajtás arány mindenhol megnövekedett a szárazságstressz során.

A négy héten át tartó stresszhatásra vonatkozóan mást tapasztaltunk az egyes fajtáknál. A föld feletti növényi részek jelentős csökkenést mutattak mind a hosszúságot, mind a szélességet, mind pedig a tömeget tekintve. Ez a nagymértékű visszaesés felelős elsősorban a megnövekedett gyökér/hajtás arányokért, kivéve a Plainsman V genotípust, ahol egyúttal jelentős gyökértömeg-növekedést is mértünk. A Cappelle Desprez és a Xiaoyan-54 fajtáknál a gyökér nem mutatott változást a szárazságstressz hatására, a Jing-411 genotípusnál viszont a gyökértömeg jelentősen visszaesett a kontroll növényekéhez képest. Tehát a további két hétig fenntartott, hosszú távú vízhiány esetében már az eltérő akklimatizációs stratégiák kerülnek előtérbe. A továbbiakban egyéb élettani paraméterek is tükrözni fogják ezt.

5. táblázat. Hathetes búzanövények hajtás- és gyökernövekedési adatai négyhetes aszálystresszt követően (40% FC), valamint kontroll körülmények között (80% FC). A gyökér/hajtás arányt a száraztömegekből számoltuk ki.

Fajta	Relatív FC	Levélhossz \pm SD [cm]	Levél-szélesség \pm SD [mm]	Gyökér FT \pm SD [g]	Hajtás FT \pm SD [g]	Gyökér SZT \pm SD [g]	Hajtás SZT \pm SD [g]	Gyökér/hajtás arány
<i>Plainsman V</i>	80%	23.42 \pm 2.85	6.90 \pm 1.00	2.94 \pm 0.81	4.61 \pm 1.52	0.30 \pm 0.04	0.59 \pm 0.12	0.51
	40%	21.60 \pm 2.61	5.40 \pm 0.58 **	2.72 \pm 0.34	2.41 \pm 0.92 ***	0.44 \pm 0.08 ***	0.40 \pm 0.10 ***	1.10
<i>Cappelle Desprez</i>	80%	27.38 \pm 1.02	6.50 \pm 0.50	3.91 \pm 0.13	2.16 \pm 0.04	0.41 \pm 0.05	0.41 \pm 0.02	1.00
	40%	22.92 \pm 4.65 *	5.60 \pm 0.62	2.78 \pm 0.22 ***	1.79 \pm 0.16 ***	0.39 \pm 0.07	0.37 \pm 0.04 ***	1.05
<i>Xiaoyan-54</i>	80%	22.10 \pm 1.54	7.10 \pm 0.70	3.87 \pm 0.48	2.46 \pm 0.21	0.43 \pm 0.09	0.41 \pm 0.05	1.05
	40%	16.88 \pm 1.39 ***	4.80 \pm 1.33 **	2.35 \pm 0.77 ***	1.10 \pm 0.36 ***	0.42 \pm 0.25	0.22 \pm 0.06 ***	1.91
<i>Jing-411</i>	80%	21.21 \pm 0.93	7.17 \pm 0.40	2.65 \pm 0.31	2.15 \pm 0.27	0.31 \pm 0.03	0.39 \pm 0.06	0.79
	40%	19.02 \pm 1.70 *	4.80 \pm 0.52 ***	1.94 \pm 0.33 ***	1.14 \pm 0.14 ***	0.24 \pm 0.06 ***	0.27 \pm 0.07 ***	0.89

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

6.2.2. Relatív víz-és prolintartalom, valamint a P5CS gén kifejeződésének nyomon követése levélben

A továbbiakban megnéztük a sejtek hidratáltsági állapotát, azaz meghatároztuk a levelek relatív víztartalmát, amelyet befolyásol i) az ozmotikus potenciált fokozó, kis molekulák felhalmozódása, valamint ii) a víztranszport a talaj-növény-atmoszféra „útvonalon”. Az előbbi a prolin mint ozmotikum mennyiségének mérésével, valamint közvetetten a prolin-bioszintézis kulcsenzimét kódoló *P5CS* gén transzkriptszintjének

meghatározásával követtük nyomon (az eredményeket a 6. táblázat foglalja össze). Az utóbbit pedig a CO₂ asszimilációjának mérésével vizsgáltuk, amelyről majd a 6.2.4. alfejezetben lesz szó.

6. táblázat. Négy-, illetve hathetes növények leveleinek relatív víz – és prolintartalma, valamint a *P5CS* gén kifejeződése a két-, illetve négyhetes aszálystresszt követően (40% FC), valamint kontroll körülmények között (80% FC). A prolintartalom és a *P5CS* gén transzkriptszintje a kontrollhoz viszonyítottan szerepel.

Fajta		Relatív FC [%]	RWC ± SD [%]	Relatív prolintartalom ± SD [%]	Relatív <i>P5CS</i> transzkripszint ± SD
<i>Plainsman V</i>	2w	80%	95.32 ± 1.00	100.00 ± 9.67	1.00 ± 0.12
		40%	89.94 ± 0.23*	128.44 ± 56.38	1.18 ± 0.14
	4w	80%	97.09 ± 1.41	100.00 ± 12.37	1.00 ± 0.07
		40%	96.37 ± 0.77	117.82 ± 10.19	2.00 ± 0.14
<i>Cappelle Desprez</i>	2w	80%	93.61 ± 1.11	100.00 ± 24.03	1.00 ± 0.09
		40%	93.69 ± 1.11	70.77 ± 10.55	4.85 ± 0.20
	4w	80%	99.13 ± 2.54	100.00 ± 15.89	1.00 ± 0.07
		40%	95.99 ± 0.73	88.81 ± 30.83	0.76 ± 0.16
<i>Xiaoyan-54</i>	2w	80%	96.65 ± 0.28	100.00 ± 36.09	1.00 ± 0.06
		40%	96.53 ± 2.55	190.00 ± 57.06	4.98 ± 0.29
	4w	80%	97.89 ± 0.56	100.00 ± 70.56	1.00 ± 0.10
		40%	97.38 ± 0.28	121.14 ± 62.43	3.86 ± 0.15
<i>Jing-411</i>	2w	80%	98.04 ± 1.92	100.00 ± 26.82	1.00 ± 0.03
		40%	99.07 ± 1.31	102.50 ± 1.15	0.75 ± 0.14
	4w	80%	96.60 ± 0.19	100.00 ± 94.80	1.00 ± 0.18
		40%	98.13 ± 0.12*	169.19 ± 69.21	7.87 ± 0.21

* $P < 0.05$

A kísérleti rendszerünkben alkalmazott szárazságstressz mértéke különbözőképpen befolyásolta az egyes fajták levelének relatív víztartalmát a kontroll növényekéhez viszonyítva, továbbá ez a változás eltérő volt a kísérlet két időpontjában is. A *Plainsman V* növények a kéthetes vízmegvonást követően csökkentették le leveleik relatív víztartalmát, a hosszú távú aszálystressz során viszont látszólag akklimatizálódtak az alkalmazott stresszhez. Ehhez hozzájárul egy emelkedő trend a prolinszint esetén mind két, mind négy hét vízmegvonás után, azonban a mért változás nem éri el a szignifikáns mértéket. Amíg az előbbi minták esetében ez nem kapcsolható a csökkent relatív víztartalomhoz, addig az akklimatizálódott növényeknél jól magyarázható a változatlan RWC a megemelkedett *P5CS* mRNS-szinttel. A *Cappelle Desprez* esetében pont ellenkezőleg alakult a

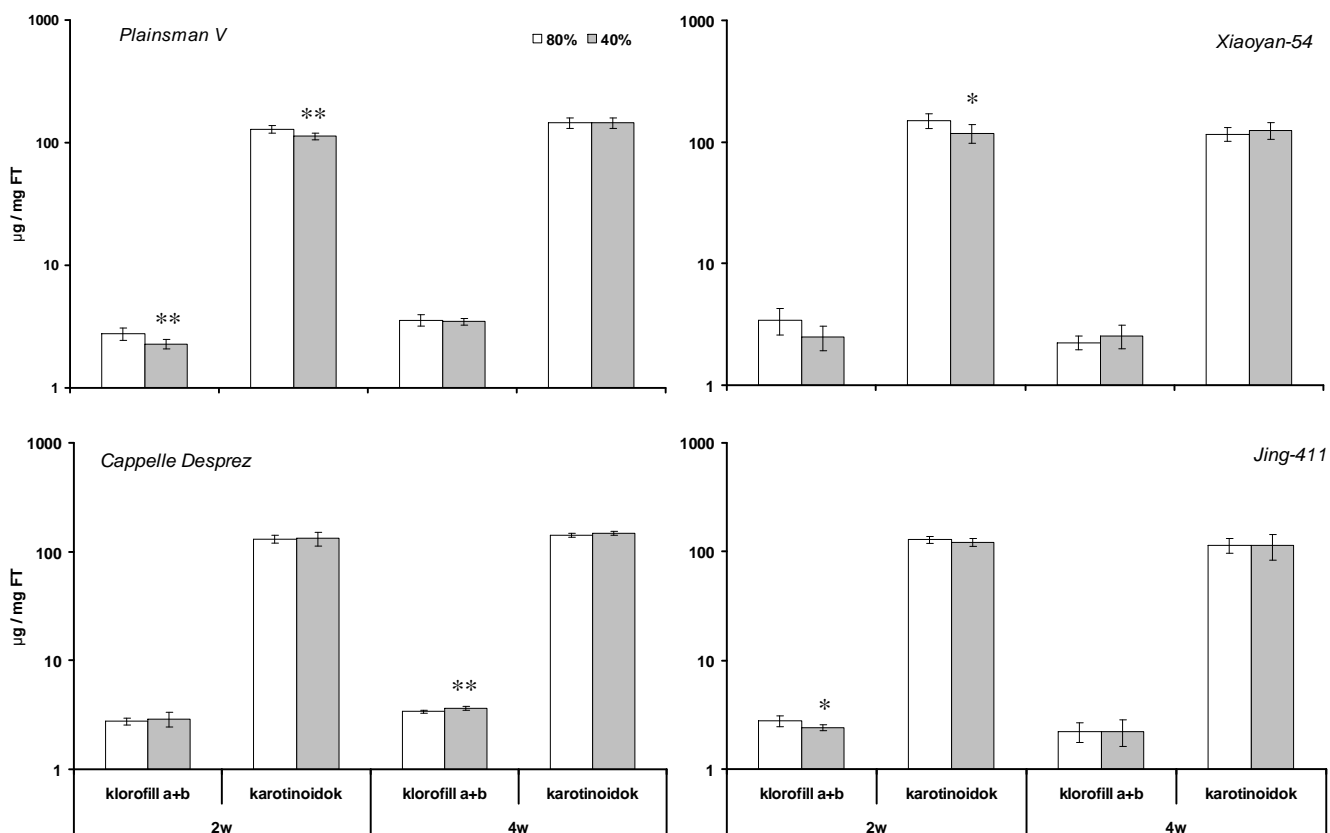
RWC-változás - a négyhetes stresszt követően lecsökkent a kontrollhoz viszonyítva, amit jól tükröz a csökkent *P5CS* transzkriptszint. A két hét vízmegvonás viszont nem hatott a levelek relatív víztartalmára. Ugyanígy a Xiaoyan-54 esetében sem – ez a fajta kitűnően kivédte mind a két-, mind a négyhetes stresszt a prolin felhalmozásával. Egyedül a szárazságra érzékeny Jing-411 válaszolt úgy az általunk alkalmazott szárazságstresszre, hogy megnövelte leveleinek relatív víztartalmát a szabad prolinszint megemelésével.

A levelek vízháztartását nagyban befolyásolja a sztómák nyitottsági állapota is – ezt a CO₂-fixáció mértékének mérésével határoztuk meg. Emellett mértük a klorofill-, illetve karotinoidtartalmat is, melyet a következő alfejezet foglal össze.

6.2.3. A fotoszintetikus pigmentek mennyiségének és összetételének alakulása

A továbbiakban azt néztük meg, hogyan változott meg az egyes búzafajták leveleinek klorofill- és karotinoidtartalma. Az eredményekből látható, hogy elsősorban a kéthetes stresszhatást követte a klorofill *a* és *b*, valamint a karotinoidok mennyiségének változása (10. ábra). A Plainsman V, a Jing-411 és a Xiaoyan-54 fajtáknál mértünk klorofillcsökkenést a kontrollhoz képest, az utóbbi fajta esetében ez nem volt szignifikáns. A szárazságra érzékeny Cappelle Desprez levelében viszont nem változott e pigmentek mennyisége a kontrollhoz viszonyítva a kéthetes vízmegvonást követően, viszont megnövekedett a négyhetes stressz hatására. Erről a genotípusról köztudott, hogy zölden szárad meg aszálystressz esetén. A mérési adatokból kikalkuláltuk külön-külön a klorofill *a* és *b* mennyiségét.

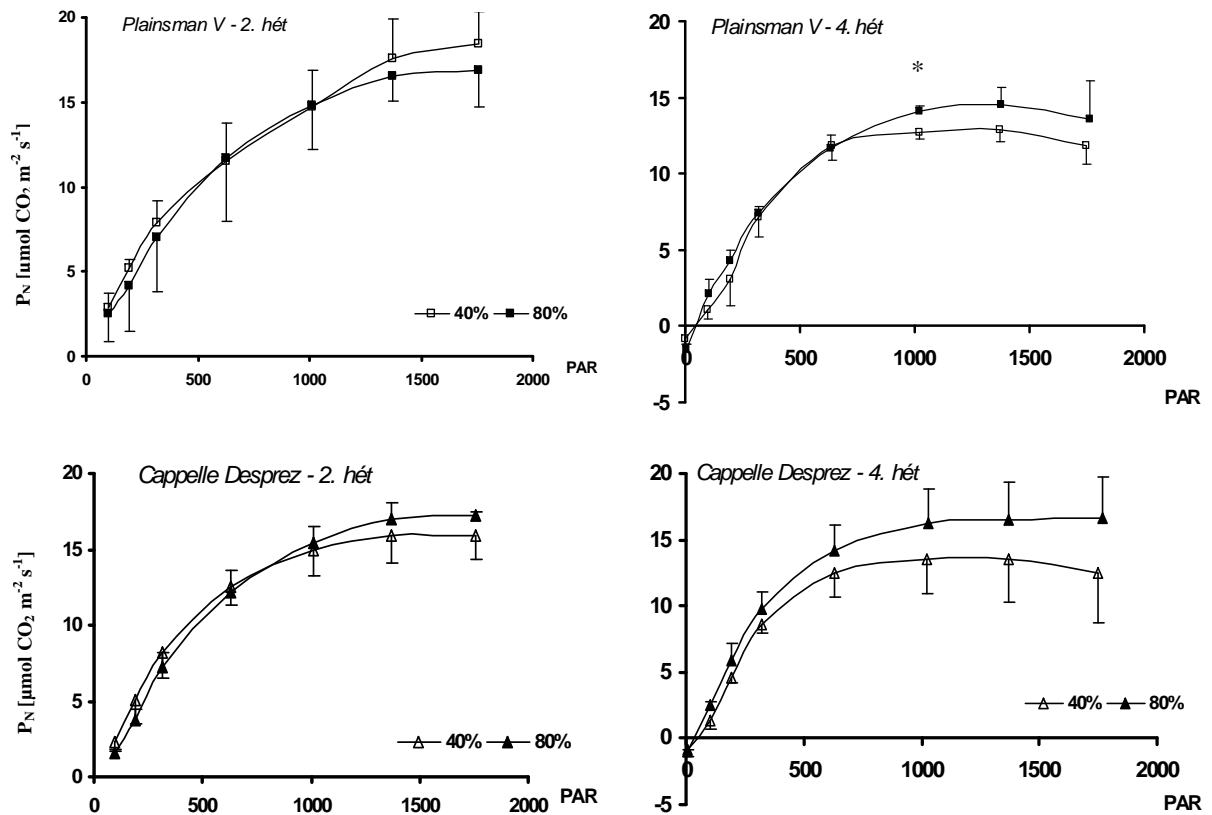
Láthattuk, hogy a két, szárazságra toleráns fajta, valamint a Jing-411 csökkentette leveleinek klorofilltartalmát, ami elsősorban a klorofill *b* mennyiségét érintette, továbbá a Xiaoyan-54 esetében a klorofill *a* koncentrációja is megcsappant. Ezzel szemben a Cappelle Desprez növényeknél megnőtt a klorofill *b* tartalma a kontrollhoz képest. Ez történt a kéthetes szárazságstresszt követően. A hathetes mintáknál ez annyiban mutatott eltérést, hogy csak a Plainsman V esetében csökkent továbbra is a klorofill *b* koncentrációja, míg a Cappelle Desprez és a Xiaoyan-54 növények ezzel ellentétben megnövelték e klorofill fajta mennyiségét. Ami a karotinoidokat illeti, a két, szárazságra toleráns fajta, a Plainsman V és a Xiaoyan-54 levelében esett vissza jelentősen a mennyiségük a kontroll növényekéhez képest, de csak a kéthetes vízmegvonást követően.



10. ábra. A klorofill- és karotinoidtartalmak változása levélben aszálystressz (40% FC) hatására a kontroll (80% FC) mintákhoz viszonyítva. A feltüntetett értékek hat független mérés átlagát mutatják a hozzájuk tartozó szórásértékekkel. A szignifikáns változást csillaggal jelöltük (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

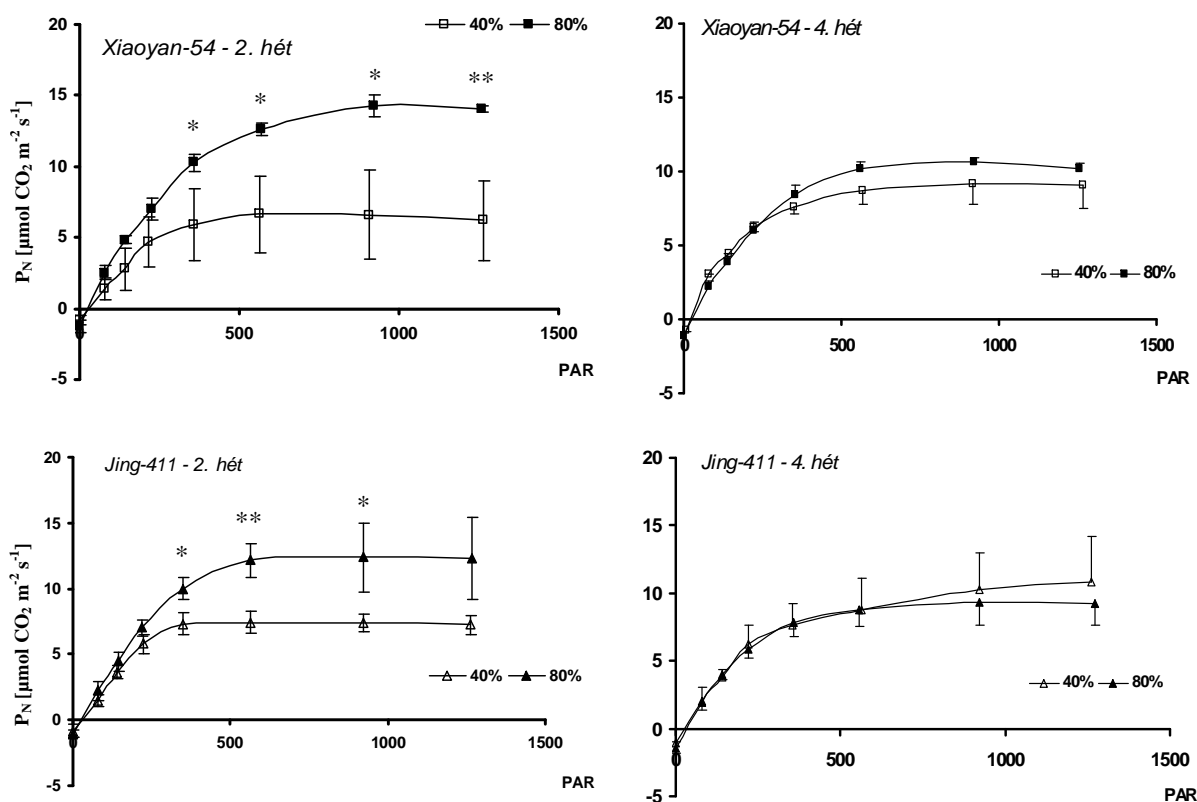
6.2.4. A fotoszintetikus paraméterek alakulása – nettó CO_2 -asszimiláció, sztómakonduktancia, transzspirációs ráta, vízhasznosítási hatékonyság

Amikor a levelek CO_2 -asszimilációját vizsgáltuk, az érdekelt bennünket, hogy mi a helyzet a sztómák nyitottsági/zártsági állapotával. Ehhez fénytélítési görbéket vettünk fel, amelyeket a 11/a. és 11/b. ábra foglal össze.



11/a. ábra. A fotoszintetikus ráta változása – fénytélítési görbén bemutatva – négy-, illetve hathetes Plainsman V és Cappelle Desprez növények esetében két- és négyhetes aszálystresszt (40% FC) követően a kontroll (80% FC) mintákhoz viszonyítva. A feltüntetett értékek három független mérés átlagát mutatják a hozzájuk tartozó szórásértékekkel. A szignifikáns változást csillaggal jelöltük (* $P < 0.05$).

A nettó CO_2 -asszimiláció (fotoszintetikus ráta; A), a transzspirációs ráta (E), a sztómakonduktancia (g_s), valamint a vízhasznosítási hatékonyság (WUE) értékét a nevelési, illetve egy magasabb fényintenzitáson adtuk meg. A 7. és a 8. táblázat ezt foglalja össze.



11/b. ábra. A fotoszintetikus ráta változása – fénytelítési görbén bemutatva – négy-, illetve hathetes Xiaoyan-54 és Jing-411 növények esetében két- és négyhetes aszálystresszt (40% FC) követően a kontroll (80% FC) mintákhoz viszonyítva. A feltüntetett értékek három független mérés átlagát mutatják a hozzájuk tartozó szórásértékekkel. A szignifikáns változást csillaggal jelöltük (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

A nevelési fényintenzitáson mért adatokból látható, hogy szignifikáns változást egyedül a kínai fajtnál mértünk: a Xiaoyan-54 fajta esetében a g_s és az E értékek csökkentek ($P < 0.05$) a kéthetes stresszt követően (emellett az A is, de a szórások túl nagyok voltak), a Jing-411 növényeknél viszont a vízhasznosítás hatékonysága (WUE) esett vissza a kontrollhoz képest ($P < 0.05$). Az előző fajtnál ez megnövekedett, habár a szórások itt is magasak voltak. A két fajta értékei összehasonlításakor egyébként nem találtunk jelentős különbséget. Nem így a Plainsman V – Cappelle Desprez párosnál. Itt ugyanis a kontroll növények WUE értékeinél mértünk szignifikáns ($P < 0.05$) különbséget a két fajta között, ami a kéthetes szárazságstresszt követően közel kiegyenlítődött – a Plainsman V-nél nőtt, a Cappelle Desprez-nél pedig csökkent. A négyhetes aszálystresszre másképp reagáltak a növények: a Plainsman V-nél visszaesett mind a CO_2 fixációja, mind a vízhasznosítás hatékonysága, ugyanígy a Cappelle Desprez-nél is. Ami a kínai párost

illeti, az *A* értékeik megnöttek, viszont a vízhasznosítási hatékonyságuk visszaesett. Mindez a nevelési fényintenzitáson történt.

7. táblázat. A levelek gázcseréjét jelző paraméterek nevelési fényintenzitásánál (~250 PAR). A feltüntetett értékek három ismételtes átlaga a hozzá tartozó szórással (SD). *A* - nettó CO₂-asszimiláció; *g_s* - sztómakonduktancia; *E* - transzspirációs ráta; WUE - vízhasznosítási hatékonyság.

Fajta	Paraméter	2w	4w		
		80% FC	40% FC	80% FC	40% FC
<i>Plainsman V</i>	<i>A</i> ± SD [μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹]	4.16 ± 2.667	5.18 ± 0.533	4.31 ± 0.708	3.03 ± 1.653
	<i>g_s</i> ± SD [mmol m ⁻² s ⁻¹]	0.10 ± 0.054	0.08 ± 0.006	0.05 ± 0.004	0.04 ± 0.014
	<i>E</i> ± SD [mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹]	1.49 ± 0.731	1.37 ± 0.110	1.22 ± 0.087	1.08 ± 0.342
	WUE ± SD [μmol mmol ⁻¹]	2.69 ± 0.658	3.82 ± 0.558	3.52 ± 0.355	2.91 ± 1.652
<i>Cappelle Desprez</i>	<i>A</i> ± SD [μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹]	3.68 ± 0.808	5.05 ± 1.499	5.83 ± 1.367	4.62 ± 0.381
	<i>g_s</i> ± SD [mmol m ⁻² s ⁻¹]	0.05 ± 0.010	0.08 ± 0.043	0.07 ± 0.034	0.07 ± 0.018
	<i>E</i> ± SD [mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹]	0.74 ± 0.123	1.13 ± 0.523	1.84 ± 0.789	1.78 ± 0.384
	WUE ± SD [μmol mmol ⁻¹]	4.99 ± 0.569	4.68 ± 0.827	3.43 ± 0.897	2.67 ± 0.590
<i>Xiaoyan-54</i>	<i>A</i> ± SD [μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹]	7.03 ± 0.771	4.68 ± 1.801	6.06 ± 0.519	6.22 ± 0.255
	<i>g_s</i> ± SD [mmol m ⁻² s ⁻¹]	0.12 ± 0.019	0.06 ± 0.026*	0.07 ± 0.008	0.09 ± 0.015
	<i>E</i> ± SD [mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹]	2.59 ± 0.248	1.56 ± 0.584*	1.80 ± 0.170	1.87 ± 0.099
	WUE ± SD [μmol mmol ⁻¹]	2.71 ± 0.161	2.99 ± 0.590	3.30 ± 0.143	3.07 ± 0.513
<i>Jing-411</i>	<i>A</i> ± SD [μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹]	7.02 ± 0.624	5.80 ± 0.728	5.90 ± 0.676	6.27 ± 1.376
	<i>g_s</i> ± SD [mmol m ⁻² s ⁻¹]	0.12 ± 0.021	0.10 ± 0.021	0.08 ± 0.018	0.08 ± 0.026
	<i>E</i> ± SD [mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹]	2.29 ± 0.330	2.29 ± 0.449	1.83 ± 0.351	2.02 ± 0.547
	WUE ± SD [μmol mmol ⁻¹]	3.08 ± 0.185	2.56 ± 0.251*	3.27 ± 0.341	3.13 ± 0.150

* *P* < 0.05

A 600 μmol m⁻² s⁻¹ fényintenzitáson mért adatok eltérnek a nevelési körülmények között mértektől, és ebből kifolyólag más az információ tartalmuk is – rálátást kapunk arra, hogy az adott paraméter, és ezen keresztül a sztómák hatékonysága mennyire fényfüggő.

A táblázatból látszik, hogy a Plainsman V növények paraméterei a fényintenzitással lineárisan növekednek, ugyanígy a Cappelle Desprez esetében is. Mindazonáltal a két fajta összehasonlításából elmondhatjuk, hogy a Plainsman V növények vízhasznosítása hatékonyabb ($P < 0.05$), mint az érzékeny Cappelle Desprez-nek, ami egy hatékonyabb sztóma működésre utal.

8. táblázat. A levelek gázcseréjét jelző paraméterek ~ 600 PAR fényintenzitásnál. A feltüntetett értékek három ismételtes átlaga a hozzá tartozó szórással (SD). A - nettó CO_2 -asszimiláció; g_s - sztóma konduktancia; E - transzspirációs ráta; WUE - fotoszintetikus vízhasznosítási hatékonyság.

Fajta	Paraméter	2w	40% FC		4w
		80% FC	40% FC	80% FC	40% FC
<i>Plainsman V</i>	$A \pm \text{SD}$ [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	11.67 ± 3.73	11.50 ± 2.25	11.63 ± 0.92	11.80 ± 0.95
	$g_s \pm \text{SD}$ [$\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0.20 ± 0.10	0.16 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.02
	$E \pm \text{SD}$ [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	2.59 ± 1.03	2.59 ± 0.49	3.02 ± 0.10	2.72 ± 0.42
	$\text{WUE} \pm \text{SD}$ [$\mu\text{mol mmol}^{-1}$]	4.60 ± 0.43	4.44 ± 0.27	3.84 ± 0.19	4.37 ± 0.31
<i>Cappelle Desprez</i>	$A \pm \text{SD}$ [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	12.13 ± 1.46	12.57 ± 1.25	14.20 ± 1.93	12.50 ± 1.81
	$g_s \pm \text{SD}$ [$\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.04
	$E \pm \text{SD}$ [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	2.13 ± 0.33	2.42 ± 0.41	3.54 ± 0.72	3.45 ± 0.49
	$\text{WUE} \pm \text{SD}$ [$\mu\text{mol mmol}^{-1}$]	5.71 ± 0.38	5.23 ± 0.35	4.06 ± 0.31	3.63 ± 0.31
<i>Xiaoyan-54</i>	$A \pm \text{SD}$ [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	12.60 ± 0.44	$6.67 \pm 2.69^*$	10.17 ± 0.44	8.72 ± 0.95
	$g_s \pm \text{SD}$ [$\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0.16 ± 0.01	$0.07 \pm 0.03^{**}$	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.04
	$E \pm \text{SD}$ [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	3.33 ± 0.12	$1.71 \pm 0.73^*$	2.48 ± 0.24	2.17 ± 0.58
	$\text{WUE} \pm \text{SD}$ [$\mu\text{mol mmol}^{-1}$]	3.78 ± 0.01	4.00 ± 0.94	3.95 ± 0.46	3.85 ± 0.64
<i>Jing-411</i>	$A \pm \text{SD}$ [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	12.13 ± 1.33	$7.44 \pm 0.86^{**}$	8.77 ± 1.27	8.75 ± 2.34
	$g_s \pm \text{SD}$ [$\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0.15 ± 0.02	$0.11 \pm 0.01^*$	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.03
	$E \pm \text{SD}$ [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	2.90 ± 0.31	2.37 ± 0.23	2.17 ± 0.41	2.30 ± 0.71
	$\text{WUE} \pm \text{SD}$ [$\mu\text{mol mmol}^{-1}$]	4.19 ± 0.13	$3.16 \pm 0.53^*$	4.10 ± 0.72	3.86 ± 0.29

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A kínai fajtákat vizsgálva elmondhatjuk, hogy a szárazságstressz hatására bekövetkezett, gyenge sztómaműködést tapasztaltunk mind a Xiaoyan-54, mind pedig a Jing-411 esetében. Ezt jól mutatja az egyes paraméterek fényintenzitástól független alakulása, ami feltételezi azt, hogy a fotoszintézis hatékonysága elsősorban a meglévő CO₂-koncentrációtól függ, amit ebben az esetben erősen befolyásol a sztómák zárt állapota. A sztómák állapotát elsősorban az ABS mint stresszhormon befolyásolja. A következő alfejezetben e hormon koncentrációjának változását ismertetjük az általunk alkalmazott aszálystresszt követően.

6.2.5. ABS-szintek gyökérben

Magát a stresszhatást, a talaj kiszáradását a növény a gyökerén keresztül érzékeli. Ebből kiindulva mértünk ABS-tartalmat a teljes gyökérhosszon, az egyes szegmensek között nem tettünk különbséget. Az ebből kapott eredményeket a 9. táblázat foglalja össze.

9. Táblázat. Négy-, illetve hathetes növények gyökereiben mért ABS-szint két-, valamint négyhetes aszálystresszt követően (40% FC), valamint kontroll körülmények között (80% FC).

Fajta	2w		4w			
	80% FC [pmol/g]	40% FC [pmol/g]	40/80	80% FC [pmol/g]	40% FC [pmol/g]	40/80
<i>Plainsman V</i>	48.75 ± 11.09	77.64 ± 14.06*	1.59	54.66 ± 14.65	747.09 ± 391.32*	13.67
<i>Cappelle Desprez</i>	42.03 ± 6.30	109.20 ± 35.77*	2.60	21.66 ± 2.51	168.23 ± 169.12	7.77
<i>Xiaoyan-54</i>	15.84 ± 3.03	183.58 ± 43.59**	11.59	19.37 ± 11.20	105.96 ± 96.52	5.47
<i>Jing-411</i>	40.93 ± 23.69	200.12 ± 86.14*	4.89	81.46 ± 10.61	192.92 ± 118.79	2.37

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A kéthetes vízmegvonás mind a négy fajta gyökerében megemelte a stresszhormon szintjét a kontroll mintákhoz viszonyítva. Ez a változás a Xiaoyan-54 fajtában volt a legnagyobb mértékű, és a Plainsman V növényeknél a legkisebb. A további kéthetes aszálystressz csupán ez utóbbinál okozott szignifikáns, de a kéthetes stressznél jóval nagyobb ABS-koncentráció növekedést.

Az élettani vizsgálatokat molekuláris kísérletek követték, amelyek elvégzésével arra voltunk kíváncsiak, mely gének lépnek működésbe, és hozhatók összefüggésbe a kapott fiziológiás eredményeinkkel. Ennek meghatározásához alkalmaztuk az általunk tervezett, közel 15 ezer oligót tartalmazó microarray-t.

6.2.6. A microarray-hibridizáció eredményének összefoglalása

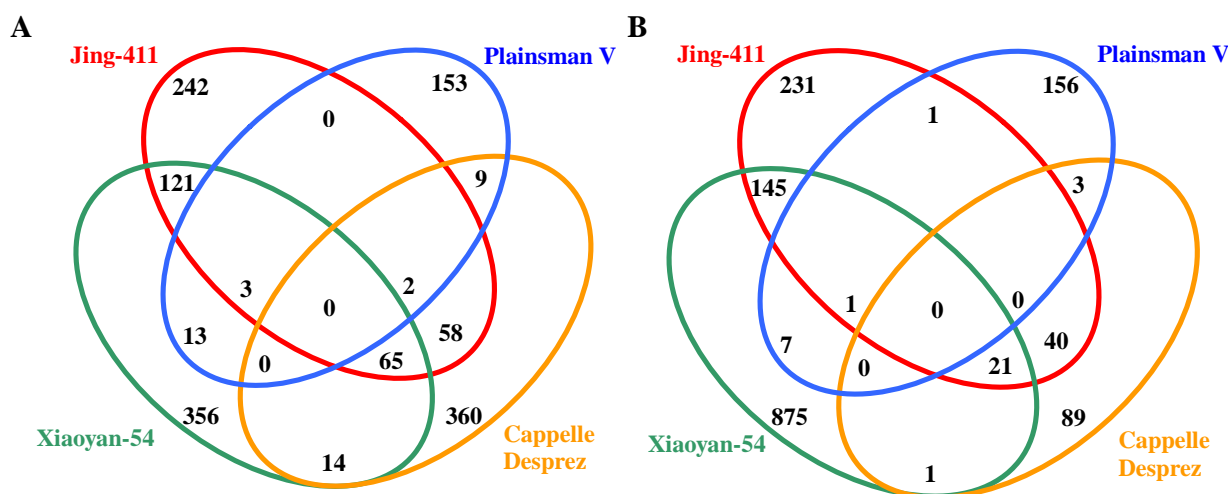
Mivel a macroarray-eredmények elemzése során azt láttuk, hogy az első két hétben sokkal több génműködési változás mérhető, mint a 3-4. héten, ezért feltételeztük, hogy a kísérlet végére (negyedik hét) szignifikánssá váló növekedési eltérések génkifejeződési alapjai a második hétre alakulnak ki, amikor már a talaj vízhiánya beállt a relatív 40% talaj-vízkapacitású szintre. Ezért a kéthetes minták microarray-technikával történő vizsgálata volt munkánk következő lépése. Ehhez a kontroll és a vízmegvonásnak kitett minták gyökereiből kivont RNS-ekből szintetizált cDNS-eket hibridizáltattuk, amellyel a folyamatos kiszáradásra növekvő, illetve csökkenő kifejeződéssel válaszoló géneket kerestük. A kiértékelésnél az első lépést a megbízható jelet adó oligók kiválogatása jelentette - ezek a háttér-intenzitásnál nagyobb értéket mutattak, figyelembe véve a színcserés ismétlésből kapott szórásértékeket mind a háttér, mind pedig a kapott jelek esetében. Így a Plainsman V fajtánál 6372 (az array-n található próbák 49%-a), a Cappelle Desprez-nél 9577 (74%), a Xiaoyan-54 esetében 8309 (64%), a Jing-411 fajtánál pedig 9845 (76%) oligót különítettünk el, amelyek mind a kontroll, mind a stressznek kitett minták esetében reprodukálhatóan mért eredményt adtak. Ezenfelül azokat a próbákat is vizsgáltuk, melyek csak a stressznek kitett (a vízmegvonás hatására kapcsolnak be), vagy csak a kontroll gyökerekben mutattak mérhető jelintenzitást (a vízmegvonás hatására hallgattak el), míg az ellenkező mintában ismételve nem érték el a detektálási szintet (10. táblázat).

10. táblázat. A vízhiány hatására megváltozott kifejeződést mutató próbák száma. Az első két oszlop esetében a zárójelek a detektált, de a háttérrel kétszeresen meg nem haladó, tehát jelentős változást nem mutató, további oligók számát tartalmazzák. A 3-4. oszlop a mindkét állapotban mérhető jelet adó próbák számát tartalmazza, zárójelben az arányuk az összes detektált oligó %-ában.

Fajta	Csak a stressz hatására (40% FC) mérhető jelet adó gének száma	Csak a kontroll mintában (80% FC) mérhető jelet adó gének száma	≥2 indukciót mutató gének száma	≤0.5 repressziót mutató gének száma
<i>Plainsman V</i>	4 (+1)	35 (+30)	176 (2.7%)	133 (2.1%)
<i>Cappelle Desprez</i>	112 (+5)	8 (+4)	396 (4.1%)	142 (1.5%)
<i>Xiaoyan-54</i>	98 (+11)	300 (+63)	474 (5.7%)	750 (9.0%)
<i>Jing-411</i>	57 (+5)	36 (+67)	434 (4.4%)	403 (4.1%)

A továbbiakban a felül-, valamint alulműködés szempontjából minden olyan próbát figyelembe vettünk, amelynek kifejeződése legalább kétszeresére növekedett, illetve a felére csökkent a stresszelt mintában a kontrollhoz képest azon próbák esetében, amelyek mind a kontroll, mind a stressznek kitett minták esetében reprodukálhatóan mért eredményt adtak. A csak a stressznek kitett, vagy csak a kontroll gyökerekben mérhető jelintenzitást mutató oligóknál a jelentős változást adókat (a háttérrel legalább kétszeresen meghaladókat) vettük figyelembe. Az összesített eredmény a 10. táblázatban található.

Megkerestük azokat a próbákat is, amelyek közösen indukálódtak vagy represszáldtak két, három, illetve mind a négy fajtában (12. ábra).



12. ábra. Mérsékelt aszálystressz által indukált (A), illetve represszált (B) próbák száma. A számok azokat a oligókat jelzik, melyek kifejeződése ≥ 2 az indukáltak, valamint ≤ 0.5 a represszáltak esetében a kontrolljukhoz képest.

Az indukált oligók esetében jól látszik, hogy számuk megközelítően egységes a Xiaoyan-54, a Jing-411 és a Cappelle Desprez között, a Plainsman V fajtában viszont kevesebb. Az alulműködő próbák pedig nagyságrenddel magasabban fordulnak elő a Xiaoyan-54 fajtában, mint a többi háromnál.

Az indukált próbák esetében a Plainsman V-nek a Xiaoyan-54 fajtával volt a legtöbb közös oligója (az indukált próbák mindössze 8.9%-a), a Xiaoyan-54 az érzékeny Jing-411 genotípussal több, mint négyszer akkora (38.5%) átfedést mutatott, a Cappelle Desprez-nek pedig a Jing-411 búzafajtával volt a legtöbb hasonlósága (24.6%).

A represszált géneket összehasonlítva is ugyanilyen kapcsolatviszonyt kaptunk a fajták között.

A közös próbák hiánya mind a négy fajtában mind az indukált, mind a represszált gének esetében adódhat egyrészt a hibridizáció minőségéből (pl. a Plainsman V fajtánál a színcserés ismétlés szerint reprodukálható eredményt adó próbák száma alacsony volt a nagy szórásból fakadóan), másrészt az egyes búzafajtákban ténylegesen más-más gének működhetnek erősebben, illetve gyengébben a vízhiány hatására.

6.2.6.1. A szárazságstressz által indukált gének funkció szerinti osztályozása

A továbbiakban a stressz által indukált génekkel és azok funkciójával foglalkoztunk. A TIGR adatbázisban szereplő GO terminológiát vettük alapul, amelyről tudnunk kell, hogy nem teljes, tehát nem minden annotált génnek van GO szerinti funkciója. Így a teljesség igénye nélkül, de a meglévő információt felhasználva jutottunk el a következő eredményhez. A Plainsman V fajta gyökerében azon gének mutattak megnövekedett kifejeződést, amelyek termékei egyrészt a szénhidrát-anyagcserében vesznek részt (többnyire β -glükozidázok, valamint trehalóz-6-foszfát-szintáz), másrészt receptor-kináz, illetve kataláz aktivitással bírnak. A katalázok a Xiaoyan-54 esetében is előfordultak, melyek mellett megnövekedett még azon gének transzkriptszintje, melyek dehidrineket, hidrolázokat, aszparagin-szintázt, illetve a glikolízis enzimeit kódolják. Ami a Cappelle Desprez növények gyökerét illeti, itt is – a Plainsman V fajtához hasonlóan – megnőtt a β -glükozidázokat kódoló gének átírása, továbbá még azon gének transzkriptszintje emelkedett meg a stressz hatására, amelyek dehidrineket, β -galaktozidázokat, lipoxigenázokat, glutation-transzferázokat, citokróm P450 mono-oxigenázokat, szerin-típusú karboxipeptidázokat, valamint a jázmonsav bioszintézisének enzimeit (allénoxid-szintáz, 12-oxo-fitodiénsav-reduktáz) kódolják. A szárazságra érzékeny Jing-411 esetében megemelkedett a Myb-típusú transzkripció faktorok, dehidrinek, a hősokkfehérjék, a hidrolázok, a nem specifikus lipidtranszfer-proteinek (nsLTP), a glutamin-szintetázok, valamint a Xiaoyan-54 fajtához hasonlóan a glikolízis enzimeinek mRNS-szintje. Ezen eredményekből látható, hogy az általunk vizsgált négy búzafajta más és más funkciójú proteinek kódoló géneket kapcsolnak be a kísérletünkben alkalmazott szárazságstressz során. A Gabonakutatóban létrehozott esőárnyékoló rendszerben sok más fajta között e négy fajta agronómiai jellemzőit is vizsgálják. Az ő

eredményeiket összevetve az általunk talált génműködési változásokkal a jövőben lehetőség lesz a fajta adaptációs stratégiájának a pontosabb megismerésére.

11. táblázat. Az általunk kiválasztott, ABS-regulált gén relatív transzkriptszintje két különböző technikával meghatározva. A feltüntetett értékek az oligo-chip esetében két, a RT-qPCR esetében három mérés átlagát mutatják a hozzájuk tartozó szórásértékekkel. Az egyes gének transzkriptszintje a kontrollhoz viszonyítottan szerepel.

Gén*	Fajta	Relatív transzkriptszint	
		oligo-chip	RT-qPCR
ABS-indukált plazmamembrán-fehérje [TA66711]	<i>Plainsman V</i>	3.70 ± 3.73	8.21 ± 0.06
	<i>Cappelle Desprez</i>	4.01 ± 0.33	31.45 ± 0.26
	<i>Xiaoyan-54</i>	18.28 ± 16.26	199.93 ± 0.16
	<i>Jing-411</i>	8.84 ± 2.27	71.01 ± 0.07
Hidegstressz-regulált fehérje [TA69106]	<i>Plainsman V</i>	0.70 ± 0.94	3.24 ± 0.11
	<i>Cappelle Desprez</i>	1.82 ± 0.60	4.73 ± 0.15
	<i>Xiaoyan-54</i>	13.91 ± 6.60	7.96 ± 0.17
	<i>Jing-411</i>	2.33 ± 0.93	4.71 ± 0.24
Sóstressz-indukált fehérje [TA54762]	<i>Plainsman V</i>	0.59 ± 0.52	1.16 ± 0.03
	<i>Cappelle Desprez</i>	1.48 ± 0.33	1.50 ± 0.09
	<i>Xiaoyan-54</i>	3.58 ± 0.35	2.64 ± 0.17
	<i>Jing-411</i>	2.16 ± 0.54	2.26 ± 0.07
Fehérje-foszfataz 2C [TA94922]	<i>Plainsman V</i>	0.97 ± 1.19	1.51 ± 0.08
	<i>Cappelle Desprez</i>	1.44 ± 0.45	1.58 ± 0.09
	<i>Xiaoyan-54</i>	3.05 ± 0.24	3.10 ± 0.29
	<i>Jing-411</i>	1.92 ± 0.20	3.43 ± 0.09

* A búza TA-k esetében az egyedi számazonosító után a taxon-azonosító szerepel: 4565.

6.2.6.2. ABS-szintet követő gének – az oligo-chip validálása

Az oligo-chip validálása szükséges volt ahhoz, hogy az eredmények megbízhatóságát igazoljuk. Ehhez kiválasztottunk négy olyan gént melyek próbáinak jelintenzitása összefüggést mutatott a gyökerekben mért ABS-koncentrációval, tehát ABS-indukált. Az oligo-chipen mért, valamint a RT-qPCR technikával kapott intenzitás-növekedés mértékéből kitűnik, hogy a két technika közel azonos tendenciájú indukciót jelzett a vizsgált gének mindegyikénél, viszont a relatív transzkript-mennyiségek értéke különbözött ($R^2 = 0.650$ 16 pontra számolva), elsősorban a két technika eltérő érzékenységből adódóan (11. táblázat).

A két hétig stresszelt növényi minták mellett a négy héten át vízhiánynak kitett egyedek esetében is megnéztük a fenn említett gének kifejeződési szintjét (12. táblázat).

A gyökerek ABS-tartalmával való könnyebb összevetés érdekében a táblázat tartalmazza az ABS-koncentrációs értékeket is. Ebből az összehasonlításból látható, hogy az általunk kiválasztott, a két hétig vízmegvonásnak kitett növényeknél az ABS által indukált gének kifejeződése a további vízhiány esetén is közel együtt mozog az ABS-koncentrációval.

12. táblázat. A négy hétig tartó aszálystressznek kitett (4w) növények gyökerében mért génkifejeződés és ABS-koncentráció. A feltüntetett értékek három mérés átlagát mutatják a hozzájuk tartozó szórásértékekkel. Az egyes gének transzkriptszintje a kontrollhoz viszonyítottan szerepel.

Fajta	Relatív transzkriptszint				ABS-koncentráció [pmol/g]	
	ABS-indukált plazmamembrán-fehérje	Hidegstressz-regulált fehérje	Sóstressz-indukált fehérje	Fehérje-foszfataz 2C	80% FC	40% FC
<i>Plainsman V</i>	36.17 ± 0.06	6.08 ± 0.04	3.19 ± 0.08	2.06 ± 0.17	54.66 ± 14.65	747.09 ± 391.32*
<i>Cappelle Desprez</i>	29.83 ± 0.10	9.06 ± 0.17	2.13 ± 0.08	2.52 ± 0.08	21.66 ± 2.51	168.23 ± 169.12
<i>Xiaoyan-54</i>	30.49 ± 0.06	5.97 ± 0.08	1.30 ± 0.10	1.36 ± 0.09	19.37 ± 11.20	105.96 ± 96.52
<i>Jing-411</i>	11.92 ± 0.12	2.81 ± 0.12	0.99 ± 0.13	1.46 ± 0.05	81.46 ± 10.61	192.92 ± 118.79

* $P < 0.05$

6.2.6.3. A szárazságstresszre toleráns és érzékeny búzafajták között különbséget mutató gének

A chip-eredmények kiértékelése során olyan géneket is kerestünk, amelyek kifejeződése eltérést mutat a szárazságstresszre toleráns és érzékeny fajták között. Így kiválogattuk azokat a próbákat, amelyek vagy a toleráns, vagy az érzékeny fajtákban mutattak megnövekedett vagy lecsökkent jelintenzitást. A 13. táblázatban összefoglalt génekkel feltételezhetően különbséget tehetünk a szárazságstresszre toleráns, illetve érzékeny búzafajták között, amit természetesen további vizsgálatokkal igazolnunk kell.

13. táblázat. A szárazságstresszre toleráns, illetve érzékeny fajták között különbséget mutató gének.

Génazonosító*	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke **			
		<i>Cappelle Desprez</i>	<i>Jing-411</i>	<i>Xiaoyan-54</i>	<i>Plainsman V</i>
CA608283	glutathion-transzferáz 28e45	5.74	2.19	-1.29	-1.33
CJ620706	glutathion-transzferáz 19E50	2.31	1.49	1.00	-1.87
CV773206	glutathion-transzferáz 19	3.12	1.68	-4.72	-2.17

13. táblázat. Folytatás.

Génazonosító*	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke **			
		<i>Cappelle Desprez</i>	<i>Jing-411</i>	<i>Xiaoyan-54</i>	<i>Plainsman V</i>
CA714997	glutation-transzferáz	2.43	2.14	-2.45	-3.32
TA62768	aquaporin PIP1	1.45	1.02	-1.27	-2.71
TA63088	PIP1	1.69	1.17	1.02	-2.69
CA605896	aquaporin PIP2.4	1.07	2.62	-1.67	-4.38
CD904299	EREB-szerű fehérje	1.39	3.41	-5.39	-2.77
BE415117	mitokondriális chaperonin-60	2.00	1.91	-2.35	-2.85
CA711214	hősokkfehérje 70	3.10	1.96	-4.76	-2.43
TA69857	hősokkfehérje 70	2.00	2.22	-2.27	-2.39
CV768110	dehidrin 8	3.23	1.39	-5.39	-2.16
CJ603633	hideg-indukált fehérje	1.89	1.54	-2.28	-4.59
CV781982	hideg-szabályzott fehérje	1.72	1.56	-2.06	-3.20
CV781671	feltételezett szerin/treonin kináz	1.80	1.43	-1.91	-2.07
CA721482	Sóstressz-tolerancia fehérje	1.00	1.87	-2.13	-4.66
TA74960	feltételezett fitoszulfokin-alfa prekurzor	3.51	3.58	1.42	-1.19
CK208781	hexózszállító	2.03	1.62	-3.34	-2.48
TA79482	feltételezett szulfátszállító	2.28	1.45	-1.32	-4.06
CK198773	prolinszállító fehérje	2.46	1.67	-1.17	-1.30
TA51101	lipidtranszfer-protein	3.01	1.97	-2.81	-2.17
CA729284	feltételezett, lipidtranszfer-protein	3.14	2.91	1.42	-1.65
DQ286550	CBF4-szerű fehérje	-3.03	-1.52	2.01	2.55
TA52294	kataláz 2	-1.15	-1.11	2.75	2.93
CJ537281	feltételezett hisztidin- kináz	-1.15	-1.19	2.00	2.01
TA51083	cinkszállító fehérje	-1.27	-1.10	2.23	2.31
BF478468	hipotetikus fehérje	-1.41	1.11	2.60	2.14
BQ160861	hipotetikus fehérje	-1.85	-1.20	1.65	2.19
BQ483822	hipotetikus fehérje	-3.45	-1.32	1.13	2.11

* A búza TA-k esetében az egyedi számazonosító után a taxon-azonosító szerepel: 4565.

** A ≥ 2 , illetve ≤ -2 mértékű változásokat félkövér számokkal emeltük ki.

Munkánk további részében - egyéb fajták bevonásával - tervezzük RT-qPCR technikával részleteiben megvizsgálni a 13. táblázat génjelöltjeit.

6.3. Az AsA-GSH ciklus génjeinek transzkriptszint-változásai a szárazságra toleráns Plainsman V, illetve az érzékeny Cappelle Desprez leveleiben

A gyökereken végzett transzkriptóma-vizsgálatokkal párhuzamosan búzakonzorciumi partnerünk, Dr. Hideg Éva ugyanebben a perlites kísérleti rendszerben a levelek fotoszintetikus és redox paramétereit vizsgálta. Ennek keretében AsA- és DHAsA-tartalmakat mért a kísérlet során hajtásban. Eredményként azt kapta, hogy az aszályra érzékeny Cappelle Desprez esetében megváltozott az aszkorbátkészlet oxidáltsági állapota a kontrollhoz képest, vagyis a DHAsA-tartalom megnőtt, míg a szárazságra toleráns Plainsman V növények leveleiben nem tapasztalt ilyen jellegű eltolódást (Sečenji és mtsai 2010a). Ezen adatokból kiindulva választ kerestünk arra, hogy vajon van-e különbség a két fajta között az AsA-GSH ciklus enzimeinek génkifejeződését tekintve szárazságstressz esetén. Ehhez először feltérképeztük az egyes enzimsaládok tagjait búzában, majd csoportspecifikus primerek segítségével meghatároztuk a különböző szubcelluláris izoformák kifejeződését.

Az alkalmazott stressz mértékét kétféle módon határoztuk meg: i) a hajtás és a gyökér friss tömegének mérésével, valamint ii) a *P5CS* gén kifejeződésének nyomon követésével.

6.3.1. Növekedési paraméterek

Az öntözőoldat mennyiségének csökkentésével párhuzamosan a növények hajtásának és gyökerének friss tömege egyaránt csökkenést mutatott a kísérlet negyedik hetére a kontroll körülmények között nevelt növényekéhez viszonyítva (14. táblázat). A gyökerek esetében elmaradt statisztika oka a tizenöt növény gyökérzetének összekuszálódása, melyeket nem szedtünk szét a mechanikai sérülés elkerülése végett. A feltüntetett adatok ebben az esetben egy átlagos gyökeret (az összgyökérzet 1/15 részét) reprezentálnak.

14. táblázat. Plainsman V és Cappelle Desprez növények hajtás-, illetve gyökértömegének változása vízmegvonás hatására

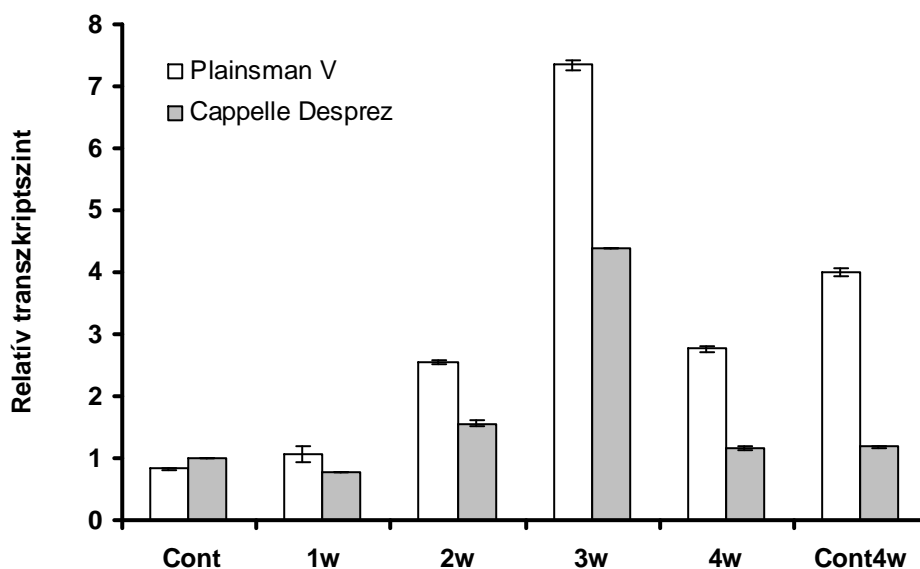
Minták	Hajtás friss tömeg [g]		Gyökér friss tömeg [g]	
	<i>Plainsman V</i>	<i>Cappelle Desprez</i>	<i>Plainsman V</i>	<i>Cappelle Desprez</i>
Cont	0.233 ± 0.056	0.221 ± 0.020	0.137	0.127
1w	0.387 ± 0.091	0.326 ± 0.106	0.232	0.167
2w	0.612 ± 0.237	0.525 ± 0.148	0.270	0.300
3w	0.818 ± 0.211	0.849 ± 0.071	0.988	0.853
4w	0.950 ± 0.323 ***	0.877 ± 0.028 ***	1.279 (-21%)	0.953 (-53%)
Cont4w	1.694 ± 0.272	1.715 ± 0.158	1.621	2.031

*** $P < 0.001$

Még a statisztika hiányában is levonható a következtetés, hogy a Cappelle Desprez növények gyökérnövekedésének szárazságstresszre bekövetkező csökkenése intenzívebb volt (53%), mint a Plainsman V növények esetében (21%). A növekedési paraméterek csökkenése egyöntetűen bizonyítja a vizsgált növények stresszelt állapotát.

6.3.2. A *P5CS* gén mint szárazságstressz-indikátor kifejeződésének nyomon követése

Amint azt az előző kísérletben láthattuk, a *P5CS* gén kiválóan alkalmas a szárazságstressz kialakulásának nyomon követésére. Ebben az összehasonlításban viszont a levelekben néztük meg a *P5CS* gén mRNS-mennyiségének változását, ami növekedést mutatott mindkét búzafajta esetében. A génkifejeződés a vízmennyiség-korlátozás harmadik hetén érte el a maximumot mindkét genotípus esetében, viszont mértékében eltért egymástól a két vizsgált fajtában – a Plainsman V növények levelében erőteljesebb indukciót (kb. hétszeres) detektáltunk, mint a Cappelle Desprez növényekében (kb. négyszeres) (13. ábra). Ugyanakkor a Plainsman V hajtásában nem csak a stresszelt, négyhetes mintában, hanem a négyhetes kontrollban is szignifikánsan (mintegy négyszeresen) magasabb *P5CS* transzkriptszintet mértünk, mint a kiindulási mintában. Ezen eredmények, továbbá a tömegadatok ismeretében elfogadtuk, hogy az általunk alkalmazott, csökkentett vízmennyiséggel való öntözés valóban stresszválaszra kényszerítette növényeinket. Ennek tudatában folytattuk további vizsgálatainkat.

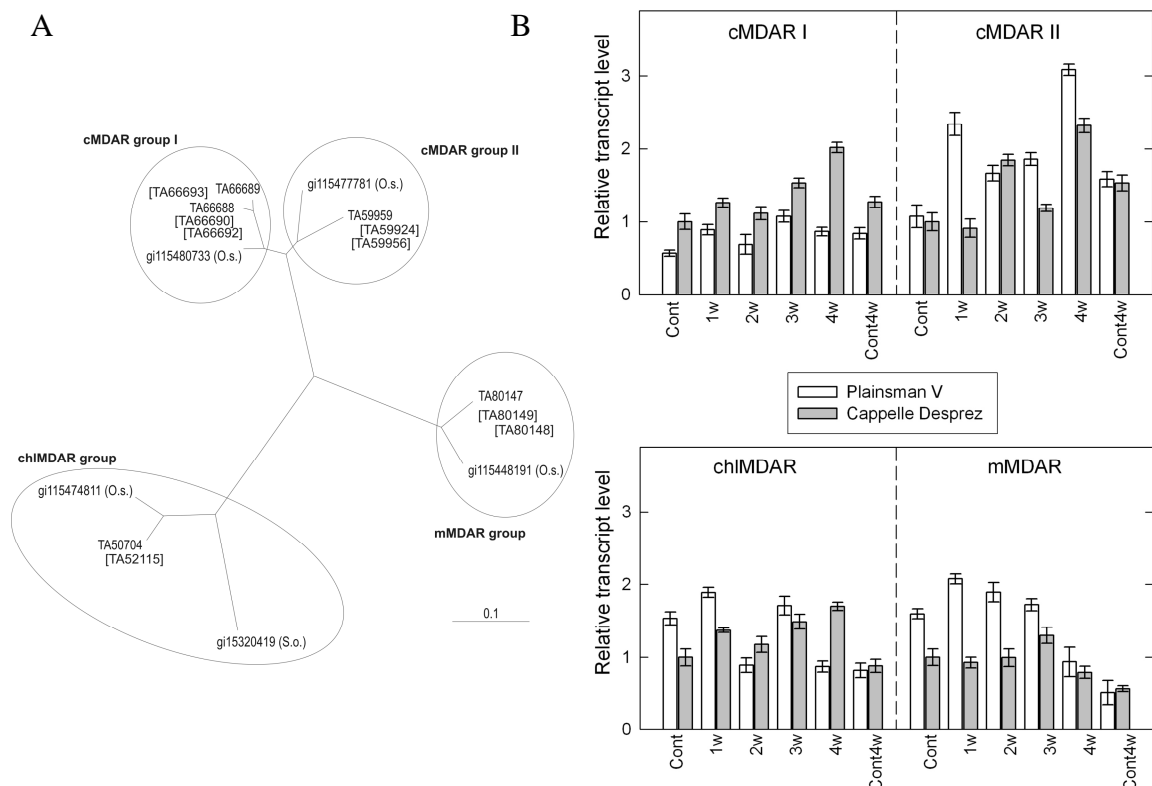


13. ábra. A *P5CS* génkifejeződése hajtásban szárazságstressz hatására. A RT-qPCR adatokat kétszer normalizáltuk: egyszer a 18S rRNS kifejeződési szintjéhez, valamint a Cappelle Desprez kezdeti mintájának transzkript-mennyiségéhez.

6.3.3. Az AsA-GSH ciklus enzimeinek típusai és génjeik hasonlósága

Ezen vizsgálataink során először átkutattuk az adatbázisokat. Olyan búzaszekvenciákat kerestünk, amelyek a hasonlósági fák alapját képezhetik. Ezek után - specifikus PCR primereket használva – megnéztük, hogy az egyes szubcelluláris típusok hogyan fejeződnek ki az általunk alkalmazott szárazságstressz hatására.

Az *APX* géncsalád hasonlósági fájának felállításához - BLAST-keresést alkalmazva - tizennégy teljes hosszúságú TA-t találtunk a búza adatbázisban, melyekhez - hasonlóságuk alapján - tizenöt részleges TA-t rendeltünk hozzá. A TA-kon kívül a GenBank adatbázisban találtunk tilakoid-kötött, illetve peroxiszómásként annotált búza APX-eket. Ezen kívül még a rizsből származó APX szekvenciák jelentettek nagy segítséget a különböző izoformák pontosabb feltérképezésében. A tizennégy TA-ból származtatott aminosav-szekvenciák többszöri illesztésével kaptunk hat APX-csoportot: két citoszolikus (cAPX I, II), két sztrómás (sAPX I, II), egy tilakoid-membránhoz kötött (tAPX) és egy peroxiszómás (mAPX) izoenzimcsoport (14A. ábra). A négy, vizsgált enzimes család közül ez bizonyult a leginkább tanulmányozottnak mind a szakirodalom által, mind a munkánk során.



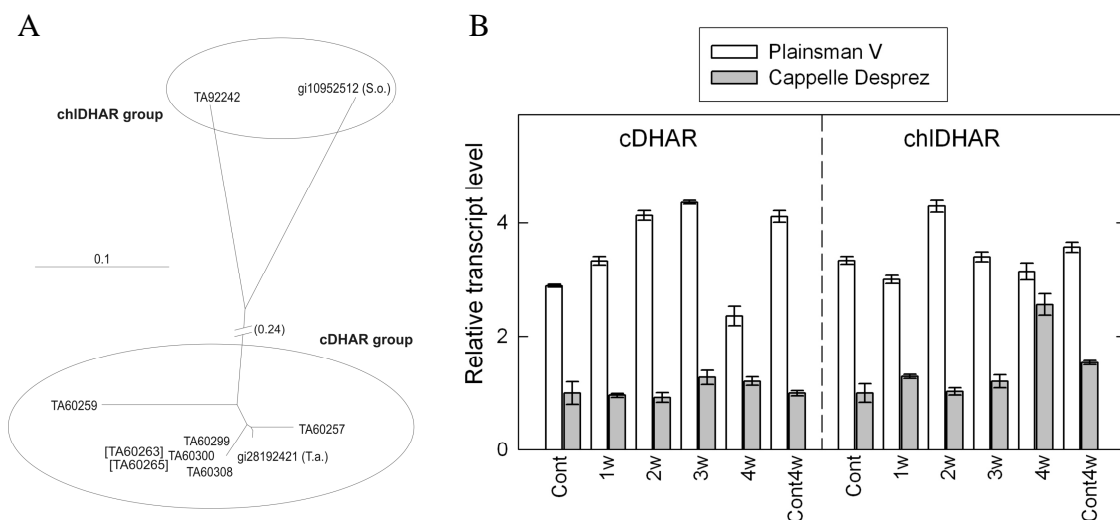
15. ábra. A búzában fellelt MDAR izoformák hasonlósági fája (A) és génkifejeződésének változása (B) az általunk használt szárazságstressz esetén.

A. A más fajokból eredő szekvenciákat GenBank azonosítóikkal ábrázoltuk. A szögletes zárójel a részleges TA-kat jelzik. A TA-k esetében csak az egyedi számazonosítót tüntettük fel (TA_{szám}_4565) a jobb átláthatóság érdekében. Az egyes ágak hosszúsága a divergencia mértékét tükrözi, melynek egységét az ábra közepén található szakasz jelzi (0.1 aminosavcsere pozíciónként).

B. Az egyes MDAR-izoformák relatív transzkriptszintjének változása a fajták levelében a redukált öntözés hatására. A feltüntetett értékek 3 ismétlés átlaga a hozzátartozó szórással.

Az MDAR géncsalád esetében már kevesebb búzaszekvenciát sikerült felkutatni: öt teljes és nyolc részleges TA-t találtunk BLAST-kereséseink során. Továbbá rizsből és spenótból származó, annotált MDAR-okat is felhasználtunk a hasonlósági fa felállításához. A más fajok MDAR-jaihoz való hasonlóságon túl a tranzitszekvencia-analízist is igénybe vettük. Az irodalomból ismert, hogy a citoszólikus MDAR-ok általában 433-436 aa-ból állnak, a valamely sejtszervecskébe irányított izoformák pedig 40-60 aa-val hosszabbak vagy az N- vagy a C-terminálison. Az N-terminális tranzitpeptidek (TP) esetében a fehérjék vagy a kloroplasztiszba, vagy a mitokondriumba szállítódnak a TP szerkezeti jellemzőitől függően (Obara és mtsai 2002). A C-terminális TP a peroxisómához irányítja a fehérjéket (Lisenbee és mtsai 2005). Esetünkben a C-terminális TP egy kihorgonyzó régióval egészült ki, ami alapján feltételezhető a fehérje kikötődése a peroxisóma

membránjához. Mindezen információk birtokában, továbbá a teljes TA-kból eredeztetett aminosav-szekvenciák többszörös illesztésével négy MDAR izoformacsoportot különítettünk el: két citoszólikus (cMDAR I, II), egy kloroplasztiszos (chlMDAR) és egy peroxiszmás (mMDAR) csoportot (15A. ábra).



16. ábra. A búzában fellelt DHAR izoformák hasonlósági fája (A) és génkifejeződésének változása (B) az általunk használt szárazságstressz esetén.

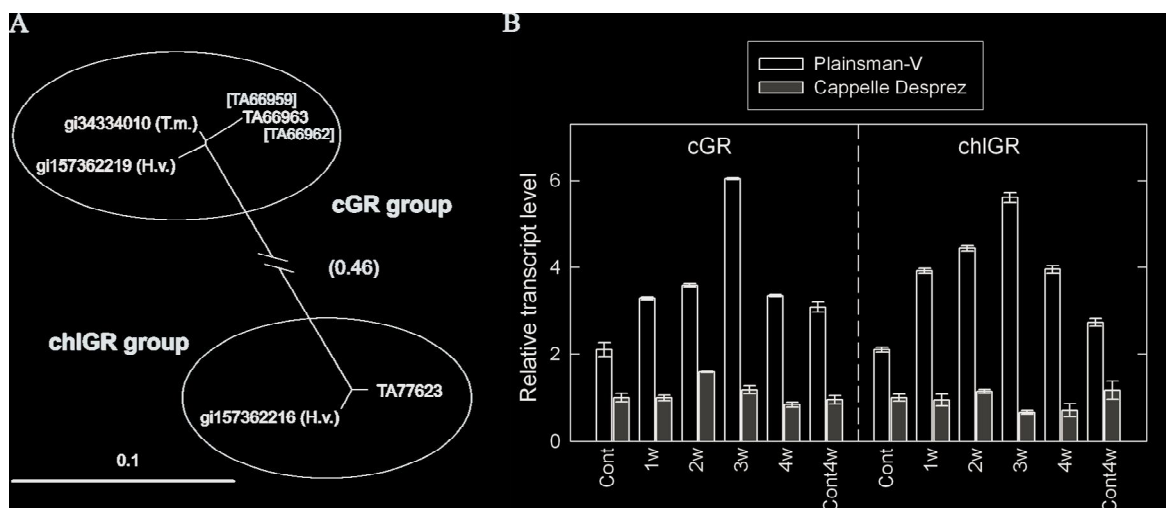
A. A más fajokból eredő szekvenciákat GenBank azonosítóikkal ábrázoltuk. A szögletes zárójel a részleges TA-kat jelzik. A TA-k esetében csak az egyedi számazonosítót tüntettük fel (TAszám_4565) a jobb átláthatóság érdekében. Az egyes ágak hosszúsága a divergencia mértékét tükrözi, melynek egységét az ábra közepén található szakasz jelzi (0.1 aminosavcsere pozíciónként).

B. Az egyes DHAR-izoformák relatív transzkriptszintjének változása a fajták levelében a redukált öntözés hatására. A feltüntetett értékek 3 ismétlés átlagai a hozzájuk tartozó szórással.

A búza *DHAR* géncsalád esetében közel ugyanannyi TA-t találtunk, mint a *MDAR*-ok esetében: hat teljes hosszúságú és két részleges szekvenciát. Annotált DHAR-ként két gént találtunk – az egyiket búzában, a másikat spenótban írták le. A nukleotid-szekvenciákból származtatott aminosav-szekvenciák többszörös illesztésének eredményeként két csoportot tudtunk elkülöníteni: egy citoszólikus (cDHAR) és egy kloroplasztiszos (chlDHAR) izoforma-csoportot (16A. ábra).

A legkevesebb búza TA-t a *GR* géncsalád feltérképezésénél találtuk - két teljes hosszúságú és két részleges szekvenciát. Annotált búza *GR*-t nem sikerült felkutatni, viszont egy *T. monococcum*-ban és két, árpa-ban leírt *GR* génnel sikerült végül megalkotni a hasonlósági fát. Ahogy az előző géncsaládoknál tettük, itt is a nukleotid-szekvenciákból

eredeztetett aminosav-szekvenciák képezték a fa alapját. Két izoforma-csoportot sikerült elkülönítenünk: egy citoszólikusat (cGR) és egy kloroplasztisz lokalizáltat (chlGR) (17A. ábra).



17. ábra. A búzában fellelt GR izoformák hasonlósági fája (A) és génkifejeződésének változása (B) az általunk használt szárazságstressz esetén.

A. A más fajokból eredő szekvenciákat GenBank azonosítóikkal ábrázoltuk. A szögletes zárójelek a részleges TA-kat jelzik. A TA-k esetében csak az egyedi számazonosítót tüntettük fel (TAszám_4565) a jobb átláthatóság érdekében. Az egyes ágak hosszúsága a divergencia mértékét tükrözi, melynek egységét az ábra közepén található szakasz jelzi (0.1 aminosavcsere pozíciónként).

B. Az egyes GR-izoformák relatív transzkriptszintjének változása a fajták levelében a redukált öntözés hatására. A feltüntetett értékek 3 ismétlés átlaga a hozzátartozó szórással.

6.3.4. Génkifejeződések változása szárazságstressz esetén

Miután meghatároztuk az egyes géncsaládok izoformáinak feltételezett, sejten belüli előfordulását, hozzáfogtunk az oligók megtervezéséhez, melyekkel az egyes izoforma-csoportok kifejeződését kívántuk követni a csökkentett öntözés során.

Az APX-ek esetében azonnal feltűnt, hogy - a kontroll körülmények között nevelt növények esetében - a toleráns Plainsman V leveleiben több transzkript található, mint a másik fajta leveleiben. Az, hogy ez a különbség a PCR-technikából adódó mérési hiba lenne kizárható, mivel az egyes fajtákban kapott amplifikációs görbék meredeksége egyező volt, így nincs okunk feltételezni, hogy a használt primerjeink eltérő hatékonysággal működtek volna a vizsgált búzában. Tekintve, hogy annotált, komplett búzagenom-szekvencia továbbra sem áll rendelkezésre, arra vonatkozó következtetéseket, hogy ez a

különbség a fajták között eltérő géncsalád-összetétel következménye lehet-e, nem tudunk levonni. A markánsan különböző kiindulási transzkriptszintekhez egy, a két fajta esetében eltérő kifejeződés-mintázat is társult. Elsősorban a négy héten át, folyamatosan redukált vízmennyiséggel öntözött növények esetében detektáltunk relatív transzkriptszint-változást. A stresszkezelt Plainsman V növények leveleiben a két, citoszólikus izoforma mutatott indukciót a kontrollhoz képest: 2.2-szeres a *cAPX I* és 2.8-szoros növekedés a *cAPX II* esetében. A stressz kezelt Cappelle Desprez növények leveleiben viszont a *cAPX I* (2.6-szoros) és a sztrómában található *sAPX II* (3.4-szeres) esetében mértünk relatív transzkriptszint-változást a kontrollhoz viszonyítva (14B. ábra).

A két búzafajta levele - kontroll körülmények kötött - közel megegyező mennyiségű *MDAR*-transzkriptet tartalmazott mindegyik izoforma esetében. A génkifejeződés növekedése ennél a géncsaládnál is a vízhiány negyedik hetében jelentkezett. A citoszólikus izoformák indukálódtak egyedül a kontrollhoz viszonyítva: a *cMDAR II* transzkript-mennyisége mindkét búzafajta esetében (2.3-szoros a Cappelle Desprez-ben és 2.9-szeres Plainsman V-ben), míg a *cMDAR I* izoformáé csupán az érzékeny Cappelle Desprez leveleiben emelkedett szignifikánsan (2.0-szeres) (15B. ábra).

A *DHAR*-izoformák kifejeződésének vizsgálatakor szintén feltűnt, hogy a toleráns Plainsman V növények levele - kontroll körülmények között - több mRNS-t tartalmaz, mint az érzékeny Cappelle Desprez növényeké. A csökkentett vízmennyiségű locsolás viszont csak az utóbbiban okozott kifejeződés-változást – a kloroplasztiszban lokalizált chlDHAR mutatott 2.5-szeres indukciót a negyedik héten (16B. ábra). Habár még így sem érte el a toleráns fajtában mért mRNS-szintet.

Amikor a búza *GR* géncsalád izoformáit is leellenőriztük, hasonló jelenséget tapasztaltunk itt is, mint az *APX*-ek és a *DHAR*-ok esetében: a toleráns Plainsman V leveleiben magasabb volt - kontroll körülmények között - az egyes izoformák mRNS-szintje, mint az érzékeny fajtában. Amikor a szárazságstressz hatását vizsgáltuk, csak a toleráns fajtában emelkedett meg mindkét izoforma transzkriptszintje a kontrollhoz viszonyítva - a többi géncsaládtól eltérően – a stressz harmadik hetében (2.9-szeres indukció a citoszólikus GR esetében, 2.7-szeres pedig a kloroplasztiszban található nál) (17B. ábra).

7. Az eredmények értékelése

Kísérleteink során válaszokat kerestünk arra a kérdésre, hogyan reagálnak a különböző búzafajták a génkifejeződés szintjén, ha hosszú lefolyású, mérsékelt szárazságstressznek tesszük ki őket? A hosszú időtartammal kívántuk elérni, hogy a növények akklimatizálódhassanak a megváltozott körülményekhez, amelyet a lehetőségekhez mérten igyekeztünk hasonlatossá tenni a természetben lezajló folyamatokhoz. A kísérleti rendszerünk fejlesztése is, a perlittől a homok-perlit keverék és a csöveken keresztül történő öntözés irányába, ezt a célt szolgálta. Bár tudjuk, hogy az általunk alkalmazott talaj távol áll a búza természetes nevelési közegétől, az RNS-kivonás és a növények fejlődése szempontjából ezt a keveréket találtuk a legmegfelelőbbnek. A stresszhatás mérsékelt mivoltát több adattal is sikerült alátámasztanunk. A stresszor megjelenése szembetűnően gátolta a növények növekedését, a szűkösen rendelkezésre álló víz korlátozta fejlődésüket, valamint a jelző génként kiválasztott *P5CS* gén megnövekedett kifejeződése is ezt támasztotta alá. Így tehát mind élettani, mind molekuláris szinten információt nyertünk a növények állapotáról. A stressz mérsékelt mivoltát talán két paraméter alakulásával írhatnánk le. Az egyik a TBARS-teszt, amely az oxidatív stressz következtében károsodott lipidek mennyiségét határozza meg, a másik a levelek relatív víztartalma (RWC). A Plainsman V és Cappelle Desprez összehasonlításban a lipidperoxidáció növekedése nem haladta meg a szignifikáns értéket egyik fajtában sem (Sečenji és mtsai 2010a), valamint a négy genotípus esetében mért RWC sem csökkent jelentősen a stressz hatására. Egyszóval, kísérleteink tervezésénél az a cél vezérelt minket, hogy a szárazsághoz való jobb alkalmazkodás folyamatát vizsgálhassuk, elkerülve a súlyos stressz okozta általános vészreakciókat.

Az első és a harmadik összehasonlítás egyazon kísérletsorozat terméke. A közös pontot a Plainsman V növények képezik - az egyik összevetésben a gyökereikben zajló változásokat vizsgáltuk, a másikon pedig az AsA-GSH ciklus enzimeinek transzkriptszintjét követtük nyomon levelekben. Azt tudjuk, hogy a növények föld feletti és alatti része eltérően viselkedik vízhiány esetén, gondolunk itt a növekedés aszimmetrikus megnyilvánulására, az eltérő funkciókból adódó más-más génexpressziós változásokra, mind mennyiségileg, mind minőségileg. A hajtás és a gyökér eltérő válaszát tapasztaltuk a *P5CS* gén transzkriptszintjének változásában is. Míg a Plainsman V gyökerében a kiindulási és négyhetes kontrollminták között nem volt jelentős eltérés (5. ábra), addig hajtásban a mRNS-szint stressz nélkül is megnőtt (13. ábra). Feltételezzük,

hogy a Plainsman V mint szárazság-toleranciára szelektált búzafajta fejlődése során eleve magasabb alapszintre emeli a *P5CS* kifejeződését hasonlóan az AsA-GSH ciklus génjeihez, ahogy ez a 6.3. alfejezetben leírt és későbbiekben diszkutált kísérleteinkből is kiderül.

Az eltérések mellett közös vonás, hogy a Plainsman V növények gyökere és hajtása egyaránt részt vett az oxidatív stressz kivédésében - mindkét részben megemelkedett a különböző antioxidáns enzimek transzkriptszintje. Ez arra enged következtetni, hogy ez a fajta a perlites rendszerben enzimatikusan védekezik a reaktív oxigénszármazékok ellen. Ezzel szemben a Kobomugi tájfajta a GST-k mRNS-szintjét növeli meg, azon belül is a tau csoport tagjait, amelyek jelentős GSH konjugatív aktivitással rendelkeznek. Ezek szerint ennél a genotípusnál a peroxidációt követő káros anyagcseretermékek eliminálása került a stresszvédekezés középpontjába. Szabadföldi kísérletek is alátámasztották, hogy a Kobomugi növényeknél erőteljesebb az oxidatív stressz mértéke, amit az MDA-tartalom vízhiány esetén való megemelkedése is bizonyít (Sečenji és mtsai 2010b). Az aszályra érzékeny Cappelle Desprez esetében megváltozott az aszkorbátkészlet oxidáltsági állapota a kontrollhoz képest, vagyis a DHAsA-tartalom megnőtt (Sečenji és mtsai 2010a). Ennek oka valószínűleg az, hogy az oxidált aszkorbát-származékok (MDAsA, DHAsA) enzimatisz visszaalakítása aszkorbinsavvá kisebb hatékonyságú.

15. táblázat. Az egyes antioxidáns izoformák kifejeződésének változása az általunk használt szárazságstressz hatására. Csak azokat tüntettük fel, amelyek legalább az egyik fajtában fokozott expressziót mutattak.

Géncsoport	Plainsman V	Cappelle Desprez
cAPX I	↑	↑
cAPX II	↑	↔
tAPX	↑	↔
sAPX II	↔	↑
cMDAR I	↔	↑
cMDAR II	↑	↑
chlDHAR	↔	↑
cGR	↑	↔
chlGR	↑	↔

Ha figyelembe vesszük a 15. táblázat összesítését az egyes izoformák kifejeződésének változásairól, akkor látható, hogy a kloroplasztisz sztrómájában lévő sAPX II kifejeződését

- ami feltehetően az eltolódott AsA/DHAsA arányt okozza - nem követi az chlMDAR fokozott expressziója.

Míg a Plainsman V egy kezdeti adaptáció (lag-fázis) után a 3-4. héten mutat nagyobb gyökértömeg-növekedést, addig a Kobomugi gyökerei a vízhiány második hetében mért gyarapodás után lassuló tendenciát mutatnak. Annak alapján, hogy a Kobomugiban a második héten kiugró kifejeződésű gének többsége a Plainsman V-ben tartósan magas transzkripszintet mutat (6C. ábra), illetve hogy a két fajta gyökérnövekedésében eltérő intenzitás mérhető, feltételezhetjük, hogy a Plainsman V fajtánál tapasztalt intenzívebb gyökérnövekedés ezen gének működésének a következménye. Úgy gondoljuk, hogy itt talán a fajták között élettani szinten tapasztalható különbségek molekuláris, génexpressziós szintű alapjainak egy részét találhattuk meg.

A Plainsman V gyökerében jelentősen megemelkedett a sejtfal-biogenezis fehérjéit kódoló gének kifejeződése, úgymint expanszinok, XET, HRGP. Ez azt sugallta, hogy e fajta gyökere „nem fogja vissza” a növekedését, hanem sejtei tovább nyúlnak. Szabadszízi kísérletekben e fajta vízhasznosítási hatékonysága megnőtt, valamint kevésbé csökkent a CO₂-asszimilációja, mint a Kobomugi tájfajtájé az alkalmazott szárazságstressz során (Sečenji és mtsai 2010b). Továbbá a homok-perlites kísérletben mértük olyan gének kifejeződés-változását, amelyek összefüggésbe hozhatók a gyökérnövekedéssel. Ilyenek voltak a represszált aquaporinok (13. táblázat), amelyek - Kaldenhoff és mtsai (1998) szerint - ha túlexpresszáltak, a gyökér - kompenzálásként - visszafogja a növekedést, mivel az aquaporinokon keresztül biztosított a megfelelő mennyiségű vízfelvétel. Ellenben ha csökken e fehérjék génjeinek kifejeződése, a gyökér elkezdheti „keresni” a vizet a talajban, azaz növekszik. A víztranszportot a már meglévő aquaporinok membránba való kihelyezésével is fokozhatja a növény. Ezt a folyamatot a H₂O₂ (is) befolyásolja - jelenlétében a transzportfehérjék mennyisége csökken a plazmamembránban, ezáltal csökkentve a vízfelvételt (Boursiac és mtsai 2008). A H₂O₂ homeosztázisának szabályozásában kulcsszerepe van a kataláznak mint a lebontásában részt vevő enzimnek (Scandalios 2005), tehát e jelmolekula szabályozási működését is kordában tudja tartani. A Plainsman V, továbbá a Xiaoyan-54 gyökerekben indukálódott kataláz enzim elláthatja e funkciót a folyamatos vízfelvétel biztosításának érdekében, habár a toleráns fajtákkal szemben a szenzitív Cappelle Desprez és Jing-411 gyökerében e gének más kifejeződés-mintázatot mutattak: az aquaporinok expressziója vagy nem változott meg a vízmegvonás hatására (Cappelle Desprez), vagy megnőtt (Jing-411). Ellenben találtunk más, sejtmegnyúlást fokozó fehérjéket kódoló gént, amely e két, utóbbi genotípusban

indukálódott. A fitoszulfokin peptidhormon részt vesz a sejtmegetnyulás szabályozásában (Kutschmar és mtsai 2009), ami arra enged következtetni, hogy a homok-perlites rendszerben e két fajta gyökérnövekedése is inkább a sejtek megetnyulásán és kevésbé az osztódásán alapul. Ellenben az indukálódó hőshockfehérjék (Hsp70) e két utóbbi búzafajtában módosíthatják a gyökérfejlődést - Sung és Guy (2003) eredményeiből kiindulva rövidebb, de elágazóbb gyökérzetet biztosítanak az adott egyedeknek.

A kataláz szerepe a sejtkárosító hatású koncentrációban jelenlévő H_2O_2 eliminálásában is számottevő, amelynek aszálystressz esetén megetny a jelentősége, hasonlóan a peroxidázokhoz. Amint láthattuk a perlites rendszer Cappelle Desprez-jében, a hajtás aszkorbát-glutation ciklusa gyengébb teljesítményű, mint a toleráns Plainsman V genotípusé. Ha ezt az eredményt összevetjük a 13. táblázatban található GST-k kifejeződés-változásával, feltételezhetjük, hogy a két, szárazságra érzékeny búzafajta a „sérült”, illetve káros peroxidációs termékek eliminálását erősítik, míg a rezisztens fajták - a károkat megelőzvéen - igyekeznek semlegesíteni a sejt számára veszélyes ROS-okat. A Cappelle Desprez esetében a lipoxigenázokat kódoló gének megetnyövekedett mRNS-szintje előrevetíti, hogy a lipidperoxidáció mértéke esetleg növekedhet is, amely megetny inkább igénybe veheti a detoxifikáló rendszert. A citokróm P450 monooxygenázok egyes alcsaládjai részt vesznek a szabad zsírsavak hidroxilációjában (pl. CYP86A; Duan és Schuler 2005), tehát az érzékeny Cappelle Desprez mind a GST-, mind a monooxygenáz-útvonalat bekapcsolja a további károsodások, illetve a sejthalál elkerülése érdekében.

Egyes lipoxigenázok az oktadekanoid-útvonal kezdeti lépését katalizálják, mely folyamat végterméke a jázmonsav (JA), illetve származékai. E növényi hormon fontos szerepet játszik a biotikus és abiotikus stressz elleni védekezésben, a növekedés, a fejlődés, valamint az öregedés szabályozásában. A bioszintézisében résztvevő egyéb enzimek - úgymint az allénoxid-szintáz (AOS), a 12-oxo-fitodiénsav-reduktáz (OPR) - kifejeződése megetnyemelkedik különböző stresszfaktorok hatására (Schaller 2001). Ha megetnyézzük, hogy a Cappelle Desprez fajtában mindezen gének indukálódnak az általunk alkalmazott szárazságstressz hatására, elmondhatjuk, hogy ennél a genotípusnál nagy valószínűséggel a JA által koordinált jelátviteli kaszkád fontos szerepet tölt be a stresszre adott válasz kialakításában.

Ha a másik három búzafajtát vizsgáljuk a jelátvitel szempontjából, a Xiaoyan-54 esetében az ozmotikus stressz érzékelésében szerepet játszó hisztidin-kináz kódoló gének kifejeződése nött meg - a Plainsman V növényekéhez hasonlóan -, míg a Jing-411 fajta gyökérében Myb-típusú transzkripciós faktorok génjei mutattak indukciót.

16. táblázat. Az egyes búzafajták szárazságstresszre adott válaszainak összefoglalása. A táblázat csak megváltozott paramétereket tartalmaz, a kontrollok %-ában kifejezve.

Fajta	Élettani változások (a kontroll %-ában)	Biokémiai változások (a kontroll %-ában)	Génkifejeződés-változások
Kobomugi	NPQ ↑ (159%) ¹ RWC ↓ (92%) ¹ WUE ↑ (115%) ¹ terméshozam/növény ↓ (60%) ¹ HI ↓ (89%)* ¹	MDA ↑ (129%) ¹ szabad Pro ↑ (168%) ¹	P5CS ↑ ² GST ↑ ² proteázok ↑ ²
Plainsman V	RWC ↓ (84 ¹ és 90% ³) WUE ↑ (153 ¹ és 142% ³) terméshozam/növény ↓ (79%) ¹ HI ↑ (115%) ¹ klorofill <i>a+b</i> ↓ (82%) ³ karotinoidok ↓ (87%) ³	szabad Pro ↑ (133 ¹ és 128% ³) APX-aktivitás ↑ (121%) ² ABS-tartalom ↑ (159%) ³	P5CS ↑ ^{2,3} trehalóz-bioszintézis enzimek ↑ ³ Hsp ↓ ³ AsA-GSH ciklus enzimek ↑ ² peroxidázok ↑ ^{2,3} kataláz ↑ ³ oxidoreduktázok ↑ ² XET, EXP, HRGP ↑ ² His-kináz ↑ ³ proteázok ↑ ² aquaporin ↓ ³
Cappelle Desprez	<i>g_s</i> ↑ (160%) ³ <i>E</i> ↑ (153%) ³ WUE ↓ (94%) ³ Ezerszemtömeg ↓ (49%)* ²	DHAsA tartalom ↑ (267%) ² szabad Pro ↓ (71%) ³ ABS-tartalom ↑ (260%) ³	P5CS ↑ ^{2,3} LEA ↑ ³ APX, MDAR, DHAR ↑ ² GST ↑ ³ CYP450 ↑ ³ lipoxigenázok ↑ ³ JA-bioszintézis enzimek ↑ ³ XET ↑ ³ proteázok ↑ ³ nsLTP ↑ ³
Xiaoyan-54	<i>A</i> ↓ (67%) ³ <i>g_s</i> ↓ (50%) ³ <i>E</i> ↓ (60%) ³ WUE ↑ (110%) ³ karotinoidok ↓ (79%) ³	szabad Pro ↑ (190%) ³ ABS-tartalom ↑ (1159%) ³	P5CS ↑ ³ LEA ↑ ³ kataláz ↑ ³ glikolízis enzimek ↑ ³ His-kináz ↑ ³ aszparagin-szintáz ↑ ³ Hsp ↓ ³ aquaporin ↓ ³
Jing-411	klorofill <i>a+b</i> ↓ (87%) ³ <i>A</i> ↓ (83%) ³ WUE ↓ (83%) ³	ABS-tartalom ↑ (489%) ³	LEA ↑ ³ glikolízis enzimek ↑ ³ Myb-típusú TF ↑ ³ glutamin-szintetáz ↑ ³ nsLTP ↑ ³ Hsp ↑ ³

* HI - harvest index (hasznos termés/biomassza, %); ** Guóth és mtsai (2009)

¹ szabadföldi kísérlet (Sečenji és mtsai 2010; Hoffmann Borbála és Sárvári Éva munkája); ² perlites kísérlet (6.1., 6.3. alfejezet); ³ homok-perlites kísérlet (6.2. alfejezet)

A két, kínai genotípusban ezenkívül jelentősen megemelkedett a glikolízis génjeinek kifejeződése (pl. fruktóz-1,6-biszfoszfát-aldoláz, glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, foszfoglicerát-mutáz), amely következtetni enged bennünket arra, hogy e két fajta gyökerében az általunk alkalmazott szárazságstressz hatására az energiatermelés fokozódik.

Mind az 5 vizsgált búzafajta gyökerében találtunk olyan, megváltozott kifejeződésű gént, amely a nitrogén-anyagcsere valamely folyamatában vesz részt. Ennek egyik, logikus magyarázata, hogy a növények kedvezőtlen körülmények között átrendezik aminosav-, illetve fehérjekészletüket, biztosítva ezzel a megfelelő válaszreakciókat. A Plainsman V és Kobomugi genotípusokban cisztein-proteázok kifejeződése indukálódott, a Cappelle Desprez gyökerekben a szerin-típusú karboxipeptidázok mRNS-szintje nőtt meg, a két, kínai fajtában pedig aszparagin-, illetve glutamin-szintetáz fehérjék génjeinek átírása fokozódott.

Ha figyelembe vesszük a szakirodalomban eddig megjelent búzagyökérrel kapcsolatos transzkriptomikai eredményeket (pl. Mohammadi és mtsai 2007; 2008), azt látjuk, hogy az általunk megfigyelt változások részben egybehangzóak (pl. egyes GST-k, aszparagin-szintázok, trehalóz-6-foszfát-szintáz, β -glükozidázok, peroxidázok génjeinek kifejeződési mintázata), részben pedig ellentétes irányúak a korábban leírtakkal (pl. aquaporinok, nsLTP-k, fitoszulfokin, CYP450, Hsp-k génjeinek kifejeződési mintázata). Az eltéréseknek számos oka lehet. Többek között magyarázhatók a vízhiány eltérő mértékével és időtartamával a használt kísérleti rendszerekben, pl. ilyen hosszú, de mérsékelt vízhiány mellett korábban nem születtek transzkriptomikai vizsgálatok gyökérben. A vizsgált fajták genotípusa alapvető befolyással bír a génkifejeződési mintázatra, és ezt már más szerzők is tapasztalták munkájuk során (pl. Mohammadi és mtsai 2007).

Tehát ha összefoglaljuk ezen adatokat (16. táblázat), akkor elmondhatjuk, hogy a Plainsman V fajta egy „avoidance” (megelőző) stratégiát folytat mérsékelt aszálystressz esetén, vagyis fenntartja a gyökérnövekedést, amihez még társul a kevésbé visszafogott CO₂-asszimiláció, valamint a fokozott WUE, amely viselkedésnek egy végső eredménye a mérsékeltén visszaesett termés hozam (Guóth és mtsai 2009; Sečenji és mtsai 2010b).

Ezzel szemben a Kobomugi tájfajta - a rendelkezésünkre álló adathalmazra alapozva - már korábban csökkent a sztóma nyitottságát (erősen visszaesett CO₂-asszimiláció), amelynek egyik jelentős következménye az oxidatív stressz megjelenése (MDA), és a hatását semlegesítő rendszer beindítása (GST). A kevésbé nyitott

sztómák következtében nincs jelentős vízvesztés (az RWC alig csökken), amit támogatnak az újonnan szintetizált ozmotikumok is (szabad prolintartalom, cukrok). Tehát ez a tájfajta az ily módon megtartott vízkészletével próbál gazdálkodni, ami kevesebb termést eredményez, mint pl. Plainsman V esetében. E víztartó tulajdonsága miatt hívják egyes források ezt a genotípust izohidrikusnak.

Az intenzív búzatermesztésben használt, magas terméshozamú Cappelle Desprez jelentősen visszafogja a termésmennyiséget szárazságstressz esetén. Ez betudható a csökkent WUE-nak, ami a fokozott transzspiráció egyik következménye, vagyis nem gazdálkodik jól a vízzel kedvezőtlen körülmények között. Nem halmoz fel ozmotikumot, viszont nagy erővel küzd az oxidatív stressz és káros hatása ellen. A klorofillja nem változik csökkent talajvíztartalom mellett: ez a fajta, megfigyelések szerint, zölden szárad meg (Gallé Ágnes, személyes közlés).

A kínai Xiaoyan-54 szintén mérsékli sztómáinak nyitottságát vízhiány esetén - csökken a fotoszintetikus kapacitás, a transzspiráció. Mindemellett ozmotikumot halmoz fel (prolin), így fenn tudja tartani turgorát. A WUE értéke nem csökken. Élettani szempontból hasonlóan viselkedik, mint a Kobomugi tájfajta, de az indukált gének köre más.

A szárazságra érzékeny Jing-411 is csökkenti gázcsere nyílásainak vezetőképességét a talajban jelentkező vízhiány hatására. Ennek következtében fotoszintézis-redukció jelentkezik nála. A Xiaoyan-54 fajtával szemben jelentős különbség, hogy leveleinek klorofill-tartalma is lecsökkent, valamint a vízhasznosítása is gyengül stressz hatására.

E két, utóbbi fajta terméshozamát illetően csupán egy forráshoz tudunk nyúlni (Majer Petra, leközzöletlen eredmények), amely szerint a Xiaoyan-54 ezerszemtömege kevésbé esik vissza, mint a Jing-411 fajtáé, a két genotípus között mért WUE különbség feltehetően ezt eredményezi mezőgazdasági szempontból.

A munkánk során a génkifejeződés mérésére használt technikákról (árpa cDNS-macroarray, búza oligo-chip, RT-qPCR) elmondhatjuk:

- az árpa cDNS-macroarray esetében egy nem génspecifikus, heterológ hibridizációról beszélhetünk, amelynek következtében az egyes géncsaládok tagjai, valamint az egymáshoz hasonló szekvenciájú gének nem különíthetők el egymástól. Ennek oka az array-n lévő cDNS-ek hossza, amely paraméter engedélyezi a nagyobb nukleotid-különbségeket a hibridizáló molekulák között. Ebből adódóan ez a technika alkalmas egy áttekintő transzkriptóma-vizsgálatra, ahol az érdekel bennünket, milyen funkciójú gének

kifejeződése változik, de a részletesebb géncsalád-analízisre (pl. GST, APX) egy érzékenyebb technika, pl. RT-qPCR alkalmazása elengedhetetlen.

- ezzel szemben az általunk tervezett oligo-chip már búzaszekvenciákat tartalmaz, amelynek specificitását jól tükrözi a kapott hibridizációs eredmények RT-qPCR-rel történő validálása. Tehát a jövőben egy átfogó transzkriptmintázat-analízisre ez utóbbit érdemes használni, de hangsúlyt kell fektetni arra, hogy a géncsaládokat ne csak egy-egy reprezentáló próba képviselje, hanem lehetőség szerint a géncsalád minden egyes tagját, ismert allélvariánsát specifikus próbával vizsgáljuk a használt chipen. Ilyen próbák hiányában mindig szükség lesz az együtt detektált allélok, génvariánsok utólagos elkülönítésére.

8. Összefoglalás

Kísérleteinket olyan búzafajtákon végeztük el, melyek különböznek egymástól szárazságtűrésben, illetve azon belül akklimatizációs stratégiában. Célunk e tulajdonságok hátterének transzkripciós szintű feltérképezése volt, melyhez a következő technikákat vettük igénybe: árpa cDNS-macroarray, búza oligo-chip és RT-qPCR. Az első technika esetén a heterológ rendszer tesztelése is a kísérlet részét képezte.

1. A két, szárazságtűrő búzafajta, a Plainsman V és a Kobomugi, különböző akklimatizációs stratégiát folytat. Az árpa cDNS-macroarray alkalmazásával olyan géneket kerestünk, amelyek alátámasztják, illetve magyarázzák e viselkedésformákat. Munkánk során elsősorban a gyökérben zajló kifejeződés-változások kerültek a középpontba, mivel ez a növényi rész találkozik először a vízhiánnyal. Az általunk alkalmazott aszálystressz egy hosszantartó (négy hét), mérsékelt vízhiány, amelynek mértékét tükrözte a növények föld feletti részeinek (hajtás) növekedésbeli redukciója, valamint a *P5CS* gén mint szárazságstressz-indikátor kifejeződésének fokozódása. A gyökérminták mRNS-éből szintetizált, jelölt cDNS-eket hibridizáltattuk az árpa cDNS-eket tartalmazó membránhoz. Az így kapott eredmények validálását a glutation-transzferáz (GST) géncsalád három tagjával (*TaGSTU1B*, *TaGST19E50* és *TaGSTZ*) végeztük RT-qPCR alkalmazásával, a kapott eredményeket pedig további két taggal (*TaGSTU2* és *TaGSTF6*) erősítettük meg. Az array-n szereplő *TaGSTU1B*, *TaGST19E50* és *TaGSTZ* kifejeződése mindkét mérési technikával hasonló trendet mutatott, habár némi mennyiségi különbséget tapasztaltunk a transzkripszintek összevetésekor. Ezen eredményekből vontuk le a heterológ rendszerre vonatkozó alapkövetkeztetéseinket, miszerint ez a technika alkalmas egy áttekintő transzkriptóma-vizsgálatra, de a részletesebb géncsalád-analízisre egy érzékenyebb technika, pl. a RT-qPCR alkalmazása elengedhetetlen. Az indukciót mutató gének funkció szerinti osztályozásánál azt az eredményt kaptuk, hogy a Kobomugi tájfajta gyökerében elsősorban a cisztein-típusú peptidázok transzkript-mennyisége nőtt meg, a Plainsman V genotípus esetében pedig az oxidoreduktázokat, a cisztein-típusú proteázokat, a peroxidázokat, valamint a sejtfallal kapcsolatos fehérjéket kódoló gének domináltak. A hasonló transzkriptmintázatot mutató gének analízisének találtunk egy olyan csoportot, amelynek tagjai tartósan magas transzkripszinten fejeződtek ki a Plainsman V növények gyökerében, míg a Kobomugiban átmeneti kifejeződés-növekedést produkáltak a vízhiány második hetében (Sečenji és mtsai 2010b). Ezek a gének különböző funkciójú fehérjéket

kódnak, amelyek többek között a transzkripció-szabályozásban, fehérjemódosításban, jelátvitelben, detoxifikációban, szénhidrát-anyagcserében vesznek részt.

2. A homok-perlites, kísérleti rendszerünk megfelelt az elvárásainknak - egy, természetes körülményekhez közelebb, jól kontrollálható rendszerről van szó, amely alkalmas hosszú távú, mérsékelt aszálystressz tanulmányozására. Tesztalanként két, szárazságra toleráns (Plainsman V, Xiaoyan-54) és két érzékeny (Cappelle Desprez, Jing-411) búzafajtát használtunk. Különböző élettani paramétereket, úgymint a hajtások és gyökerek tömegét, illetve a levelek hosszát, szélességét; relatív víztartalmát; a fotoszintézist a CO₂-asszimilációt, valamint a klorofilltartalom meghatározásával, mértünk. Ezen felül még meghatároztuk az ABS-tartalmat a gyökerekben, illetve a prolinszintet a levelekben. Ezen adatokat az általunk tervezett, búza oligo-chip hibridizációjából származó eredményekkel egészítettük ki, melynek alapját a gyökérmintákból kivont mRNS-ek képezték. A négy fajta gyökerében a vízmegvonás hatására különböző funkciójú gének kifejeződése változott meg, habár voltak átfedések, pl. a Plainsman V és a Xiaoyan-54 gyökerében a katalázok, a Plainsman V fajtát és a Cappelle Desprez-t összehasonlítva a béta-glükozidázok, valamint a Xiaoyan-54 és a Jing-411 gyökerét tekintve a glikolízis-enzimek, továbbá három fajtában „felbukkantak” a dehidrinek. Viszont ha nem az egyes géneket vesszük figyelembe, hanem magát a funkciót, akkor elmondhatjuk, hogy mind a négy fajtában indukálódott a jelátvitel, a nitrogén-anyagcsere, a sejtmegnyúlás, az oxidatív stressz elleni védekezés, csak az egyes fajták különböző géneket aktiváltak ugyanannak a folyamatnak az erősítésére. Például a jelátvitelt tekintve a Plainsman V gyökerében a hisztidin-kináz indukálódott, ami a jelérzékelésben játszik szerepet, és ami a Xiaoyan-54 esetében szintén megemelkedett. A Cappelle Desprez gyökerében a JA-út vonal dominált, amit a hormon bioszintézis-enzimeinek az indukciója tanúsított. A másik érzékeny fajta, a Jing-411 esetében viszont a Myb-transzkripciós faktorok kifejeződése nőtt meg, amelyek már közvetlenül befolyásolják az egyes válasz gének kifejeződését. Ha a rendelkezésünkre álló adathalmazt összességében tekintjük, végeredményként megkapjuk, hogy az élettani eredmények összefüggésben vannak a génexpressziós adatokkal, amelyekből felépíthetjük az egyes búzafajták akklimatizációs stratégiáit. Továbbá találtunk olyan „toleranciagéneket”, amelyek expressziós változása csak a szárazságra rezisztens, illetve szenzitív fajtákra jellemző. A vizsgált négy fajta esetében ilyen génjelöltek többek között a GST-k, a hősokkfehérjék, az aquaporinok, a különböző transzporterek, a nem specifikus lipidáthelyező fehérjék, a katalázok és a hisztidin-kinázok.

3. Az APX az aszkorbát-glutation ciklus egyik kulcsenzime, funkciója a H_2O_2 redukálása vízzé AsA felhasználásával. A reakcióban az AsA oxidálódik MDAsA-vá, illetve DHAsA-vá. A visszaredukálás a MDAR és a DHAR feladata, ez utóbbi GSH-függő, a keletkezett GSSG-t a GR redukálja vissza. E négy enzimes család vizsgálatán keresztül hasonlítottuk össze a szárazságra rezisztens Plainsman V-t az aszályra érzékenyen reagáló Cappelle Desprez-vel. Munkánk első lépését az egyes családok izoenzimjéből álló hasonlósági fák megalkotása képezte, melyhez az adatbázisokban fellelhető búzaszekvenciákat használtuk fel. Az egyes izoformák különböző sejtkompartmentekben találhatók, és az egyes organelumokra lebontva elmondhatjuk, hogy a búzában találtunk két APX-et (cAPX I, II), két MDAR-t (cMDAR I, II), egy DHAR-t (cDHAR) és egy GR-t (cGR), melyek a citoplazmába prediktálhatók. A kloroplasztisz sztrómájában két APX-et (sAPX I, II), egy-egy MDAR-t (chlMDAR), DHAR-t (chlDHAR) és GR-t (chlGR), valamint egy tilakoid-membránhoz kötött APX-et (tAPX). Ezen kívül pedig egy, a peroxiszóma membránjához kihorgonyzott APX (mAPX) és MDAR (mMDAR) gazdagította a kört. Az egyes izoformák kifejeződését és annak vízhiány hatására bekövetkező változását levelekben vizsgáltuk. Az eredményekből elmondhatjuk, hogy az APX-ek között volt, amelyik csak a Plainsman V-ben (cAPX II és tAPX), csak a Cappelle Desprez levelekben (sAPX II), illetve mindkettőben (cAPX I) indukálódott. Az MDAR-ok közül csak a citoplazmában megtalálhatók transzkriptszintje nőtt meg mindkét fajtában (cMDAR II), illetve csak a Plainsman V (cMDAR I) hajtásában. Az a tény, hogy a Cappelle Desprez esetében a sAPX indukcióját nem követte a kloroplasztisz sztrómájában lévő chlMDAR megnövekedett mRNS-szintje, összecseng azzal a mérésünkkel, hogy ebben a fajtában eltolódott az AsA/DHAsA arány az oxidált állapot irányába, vagyis felszaporodott a DHAsA, amit nagy valószínűséggel az indukálódó chlDHAR fog majd redukálni. Ezzel szemben a Plainsman V-ben nem találtunk hasonló, redoxegyensúly-eltolódást, amit a citoplazmában előforduló változások híven tükröznek (cAPX és cMDAR). A GR-ok csak ez utóbbi fajtában mutattak a szárazságstresszre megnövekedett kifejeződést. Az AsA-GSH ciklus enzimeit tekintve a toleráns Plainsman V kifejezettebben küzd az aszályt kísérő oxidatív stressz ellen, ami megmutatkozik az egyes izoformák kontroll körülmények között mért transzkriptszintjében is (Sečenji és mtsai 2010a).

9. Summary

In our experiments, we examined several wheat genotypes differing in drought tolerance or in acclimation strategy. Our aim was to reveal the transcriptional background of these differences applying various techniques: barley cDNA macroarray and wheat oligo-chip hybridization, and real-time RT-qPCR.

1. The two drought-tolerant wheat genotypes, cv. Plainsman V and landrace Kobomugi, follow distinct acclimation strategies. Our goal was to identify the genes responsible for the genetic difference and detect their transcriptional changes during drought stress using barley cDNA macroarray. The main plant part investigated was root because it meets and senses water deficit before any other organ. The drought stress we applied was a long-term (four-week-long) and moderate soil water reduction. Its effect was reflected in the decrease of shoot growth as well as in the increased expression level of *P5CS* gene. Radioactively labelled cDNAs synthesized from root mRNAs were hybridized to membrane carrying barley cDNAs. The validation of array data was done by real-time RT-qPCR examining a few members of glutathione S-transferase (GST) gene family. *TaGSTU1B*, *TaGSTI9E50* and *TaGSTZ* showed the same expression trend with both methodologies; however the measurements with both methods showed quantitative differences. Therefore, we concluded that groups of related genes, gene families were detected easily in our experiments, but a more specific method (e.g. RT-qPCR) has to be applied to distinguish between individual gene variants. In addition, oxidoreductases, peroxidases and cell wall-related genes were significantly induced only in Plainsman V while induction of stress- and defense-related genes was more pronounced in Kobomugi. During the four-week-long moderate water-deficit in young plantlets, we identified a set of up-regulated genes displaying transiently increased expression, mostly on the second week in roots of the Kobomugi genotype while their transcript levels remained constantly high in roots of Plainsman V plants. These genes encode proteins with various functions, such as transport, protein and carbohydrate metabolism, osmoprotectant biosynthesis, and detoxification as well as regulatory proteins (Sečenji et al. 2010b).

2. The sand-perlite based experimental system was developed to be more similar to the natural conditions during long-term moderate water-deficit stress. The wheat genotypes we applied were two drought-tolerant (Plainsman V, Xiaoyan-54) and two drought-sensitive (Cappelle Desprez, Jing-411) ones. Various physiological features were measured, such as weight of shoots and roots; length, width and relative water content of

leaves; photosynthesis via determination of CO₂ assimilation and chlorophyll content as well as ABA concentrations in roots and proline levels in leaves. These results were completed with wheat transcript profiling data originated from the hybridization of root samples subjected to two-week-long water deprivation. Analyzing transcriptional data, genes with distinct functions were up-regulated in the root of four genotypes subjected to water deficit, however there were some overlapping, e.g. the mRNA levels of catalase gene were increased both in Plainsman V and Xiaoyan-54; the same was detected in case of beta-glucosidases in the root of Plainsman V and Cappelle Desprez, in addition with the common transcript induction of glycolysis enzymes in the case of Xiaoyan-54 and Jing-411 plants. Furthermore, dehydrins were among the up-regulated genes in three cultivars. However, if we focus on the function itself, signal transduction, nitrogen metabolism, cell elongation and detoxification were induced in all genotypes, though via different gene activation at distinct steps of the pathways. For example, histidine kinases, responsible for sensing, were up-regulated in the root of Plainsman V together with Xiaoyan-54. Jasmonic acid (JA) signaling pathway was dominated in the root of Cappelle Desprez under dry conditions which was confirmed by the increased expression levels of JA biosynthetic enzymes. In the other drought-sensitive genotype, Jing-411, the transcript amount of Myb transcription factors was induced that are direct transcriptional regulators of drought response genes. As a conclusion, there is a strong connection between expression data and physiological parameters resulting a genotype specific acclimation strategy. In addition, we found several “tolerance genes” showing different transcript profile in the drought-tolerant and sensitive cultivars subjected to water-deficit stress, such as GSTs, Hsps, aquaporins, various transporters, non-specific lipid transfer proteins, catalases, and histidine kinases.

3. Ascorbate peroxidase (APX) is the enzyme of AsA-GSH cycle together with MDAR, DHAR and GR on the purpose of H₂O₂ detoxification. We compared two wheat genotypes, the drought-tolerant Plainsman V and the drought-sensitive Cappelle Desprez, examining these four gene families subjected to reduced amounts of irrigation water. Firstly, phylogenetic trees were created using wheat sequences found in databases. Various isoforms were found, their localization was predicted to cytosol (cAPX I, II; cMDAR I, II; cDHAR, and cGR), to stroma of chloroplast (sAPX I, II; chlMDAR; chlDHAR, and chlGR) and bound to the thylakoid membrane (tAPX), and anchored to the membrane of peroxisome (mAPX and mMDAR). Expressional changes of different isoforms were detected in leaves using real-time RT-qPCR. Among APX coding mRNAs, expression

levels cAPX I and II as well as tAPX variants increased significantly in Plainsman V while cAPX I and sAPX II coding transcripts were found to be higher in Cappelle Desprez after a four-week-long water-deficit stress. Examining the MDARs, cMDAR I and II displayed significant up-regulation of mRNA levels in the sensitive genotype, whereas only cMDAR II did in the tolerant cultivar. We found an up-regulated chlDHAR mRNA only in the sensitive Cappelle Desprez. However, increased expression levels of cGR and chlGR were detected only in the tolerant Plainsman V. After four weeks of reduced irrigation, a significantly lower AsA/DHAsA ratio was detected in leaves of the sensitive Cappelle Desprez than in the tolerant Plainsman V. Comparing the expression data with the ascorbate redox status, mRNA levels of stromal APX increased in the sensitive Cappelle Desprez which resulted in a shifted AsA/DHAsA ratio in the absence of the up-regulated transcript amount of stromal MDAR. On the other hand, the tolerant Plainsman V generally possesses a high amount of transcripts of each isoform coupled with a parallel up-regulation of mRNAs of cytosol localized APX and MDAR. These results indicate that more robust transcription of ascorbate based detoxification machinery in Plainsman V may serve to avoid the adverse shift of the cellular redox balance (Sečenji et al. 2010a).

10. Irodalomjegyzék

- Alexandersson E., Frayse L., Sjøvall-Larsen S., Gustavsson S., Fellert M., Karlsson M., Johanson U., Kjellbom P. (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins, *Plant Molecular Biology*, **59**, 469-484.
- Alsheikh M.K., Heyen B.J., Randall S.K. (2003) Ionbinding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 40882-40889.
- Aprile A., Mastrangelo A.M., De Leonardis A.M., Galiba G., Roncaglia E., Ferrari F., De Bellis L., Turchi L., Giuliano G., Cattivelli L. (2009) Transcriptional profiling in response to terminal drought stress reveals differential responses along the wheat genome. *BMC Genomics*, **10**, 279.
- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 601-639.
- Baek K.-H., Skinner D.Z. (2003) Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, **165**, 1221-1227.
- Bannai H., Tamada Y., Maruyama O., Nakai K., Miyano S. (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**, 298-305.
- Bartels D., Sunkar R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **24**, 23-58.
- Bartoli C.G., Yu J., Gómez F., Fernández L., McIntosh L., Foyer C.H. (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1621-1631.
- Bates L.S. (1973) Rapid determination of free proline content for water-stress studies. *Plant Soil*, **39**, 205-207.
- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcíarrubio A., Campos F., Covarrubias A.A. (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, **148**, 6-24.
- Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G., Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, **340**, 783-795.
- Bennett M.D., Leitch I.J. (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, **76**, 113-176.
- Boursiac Y., Boudet J., Postaire O., Luu D.-T., Tournaire-Rouxand C., Maurel C. (2008) Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *The Plant Journal*, **56**, 207-218.
- Brini F., Hanin M., Lumbreras V., Amara I., Khoudi H., Hassairi A., Pages M., Masmoudi K. (2007) Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, **26**, 2017-2026.

- Burbidge A., Grieve T., Jackson A., Thompson A., Taylor I.** (1997) Structure and expression of a cDNA encoding a putative neoxanthin cleavage enzyme (NCE), isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) library. *Journal of Experimental Botany*, **47**, 2111-2112.
- Burritt D.J., Larkindale J., Hurd C.L.** (2002) Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta*, **215**, 829-838.
- Caraux G., Pinloche S.** (2005) PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* **21**, 1280-1281.
- Chen T.H.H., Murata N.** (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 250-257.
- Chew O., Whelan J., Millar A.H.** (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 46869-46877.
- Childs K.L., Hamilton J.P., Zhu W., Ly E., Cheung F., Wu H., Rabinowicz P.D., Town C.D., Buell C.R., Chan A.P.** (2007) The TIGR Plant Transcript Assemblies database. *Nucleic Acids Research*, **35**, D846-D851.
- Chaumont F., Barrieu F., Jung R., Chrispeels M.J.** (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiology*, **122**, 1025-1034.
- Dalton D.A., Baird L.M., Langeberg L., Taugher C.Y., Anyan W.R., Vance C.P., Sarath G.** (1993) Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiology*, **102**, 481-489.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K., Mittler R.** (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **17**, 268-281.
- De Leonardis S., De Lorenzo G., Borraccino G., Dipierro S.** (1995) A specific ascorbate free radical reductase isozyme participates in the regeneration of ascorbate scavenging toxic oxygen species in potato tuber mitochondria. *Plant Physiology*, **109**, 847-851.
- Duan H., Schuler M.A.** (2005) Differential expression and evolution of the *Arabidopsis* CYP86A subfamily. *Plant Physiology*, **137**, 1067-1081.
- Dynowski M., Schaaf G., Loque D., Moran O., Ludewig U.** (2008) Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochemical Journal*, **414**, 53-61.
- Eapen D., Barroso M.L., Ponce G., Campos M.E., Cassab G.I.** (2005) Hydrotropism: root growth responses to water. *TRENDS in Plant Science*, **10**, 44-50.
- Edwards R., Dixon D.P.** (2005) Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, **401**, 169-186.

- Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, **300**, 1005-1016.
- Fan L., Neumann P.M.** (2004) The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profiles of proton flux and cell wall pH. *Plant Physiology*, **135**, 2291-2300.
- Flexas J., Ribas-Carbó M., Bota J., Galmés J., Henkle M., Martínez-Cañellas S., Medrano H.** (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist*, **172**, 73-82.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J.** (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, **92**, 696-717.
- Gallé Á., Csiszár J., Secenji M., Guóth A., Cseuz L., Tari I., Györgyey J., Erdei L.** (2009) Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerances: response to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, **166**, 1878-1891.
- García-Valenzuela X., García-Moya E., Rascón- Cruz Q., Herrera-Estrella L., Aguado-Santacruz G.A.** (2005) Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyllic cells. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 650-661.
- Gollan T., Schurr U., Schulze E.D.** (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in xylem sap composition of *Helianthus annuus*. I. The concentration of cations, anions, amino acids in, and pH of the xylem sap. *Plant, Cell and Environment*, **15**, 551-559.
- Guo Z., Ou W., Lu S., Zhong Q.** (2006) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 828-836.
- Guóth A., Tari I., Gallé Á., Csiszár J., Pécsváradi A., Cseuz L., Erdei L.** (2009) Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels, and grain yield. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**, 167-176.
- Hachez C., Zelazny E., Chaumont F.** (2006) Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 1142-1156.
- Hara M., Fujinaga M., Kuboi T.** (2004) Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**, 657-662.
- Hara M., Fujinaga M., Kuboi T.** (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 2695-2703.
- Harrak H., Azelmat S., Baker E.N., Tabaeizadeh Z.** (2001) Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome*, **44**, 368-374.
- Hartung W., Wilkinson S., Davies W.J.** (1998) Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 361-367.
- Hirayama T., Shinozaki K.** (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal*, **61**, 1041-1052.

- Holbrook N.M., Shashidhar V.R., James R.A., Munns R.** (2002) Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1503-1514.
- Hong C.-Y., Hsu Y.T., Tsai Y.-C., Kao C.H.** (2007) Expression of ascorbate peroxidase 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 3273-3283.
- Iuchi S., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2000) A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiology*, **123**, 553-562.
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **27**, 325-333.
- Ishikawa F., Suga S., Uemura T., Sato M.H., Maeshima M.** (2005) Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, **579**, 5814-5820.
- Ishitani M., Xiong L., Stevenson B., Zhu J.-K.** (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell*, **9**, 1935-1949.
- Jang I.-C., Oh S.-J., Seo J.-S., Choi W.-B., Song S.I., Kim C.H., Kim Y. S., Seo H.-S., Choi Y.D., Nahm B.H., Kim J.-S., Seo H.-S., Choi Y.D., Nahm B.H., Kim J.-K.** (2003) Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology*, **131**, 516-524.
- Jauh G.Y., Fischer A.M., Grimes H.D., Ryan Jr. C.A., Rogers J.C.** (1998) Delta-Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 12995-12999.
- Kaldenhoff R., Grote K., Zhu J.J., Zimmermann U.** (1998) Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **14**, 121-128.
- Kaldenhoff R., Fischer M.** (2006) Aquaporins in plants. *Acta Physiology*, **187**, 169-176.
- Kawaura K., Mochida K., Yamazaki Y., Ogihara Y.** (2006) Transcriptome analysis of salinity stress responses in common wheat using a 22 k oligo-DNA microarray. *Functional & Integrative Genomics*, **276**, 304-312.
- Kebeish R., Niessen M., Thiruveedhi K., Bari R., Hirsch H.J., Rosenkranz R., Stabler N., Schonfeld B., Kreuzaler F., Peterhansel C.** (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, **25**, 593-599.

- Kimball B.A.** (1983) Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agronomy Journal*, **75**, 779–788.
- Kopka J., Provart N.J., Müller-Röber B.** (1997) Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. *Plant Journal*, **11**, 871-882.
- Kutschmar A., Rzewuski G., Stührwohldt N., Beemster G.T.S., Inzé D., Sauter M.** (2009) PSK- α promotes root growth in Arabidopsis. *New Phytologist*, **181**, 820-831.
- Kwasniewski M., Szarejko I.** (2006) Molecular cloning and characterization of β -expansin gene related to root hair formation in barley. *Plant Physiology*, **141**, 1149-1158.
- Lai Q.-X., Bao Z.-Y., Zhu Z.-J., Qian Q.-Q., Mao B.-Z.** (2007) Effects of osmotic stress on antioxidant enzymes activities in leaf discs of P_{SAG12}-IPT modified gerbera. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **8**, 458-464.
- Lange M., Himmelbach A., Schweizer P., Scholz U.** (2007) Data Linkage Graph: computation, querying and knowledge discovery of life science database networks. *Journal of Integrative Bioinformatics*, **4**, 68.
- Lascano H.R., Antonicelli G.E., Luna C.M., Melchiorre M.N., Gómez L.D., Racca R.W., Trippi V.S., Casano L.M.** (2001) Antioxidant system response in different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Australian Journal of Plant Physiology*, **28**, 1095-1102.
- Lawlor D.W., Tezara W.** (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*, **103**, 561-579.
- Lee B.R., Jung W.J., Lee B.H., Avice J.C., Ourry A., Kim T.H.** (2008) Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. *Physiologia Plantarum*, **132**, 329-337..
- Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Rio L.A.** (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiology*, **138**, 2111-2123.
- Levitt J.** (1972) Responses of plants to environmental stress. Academic Press, N.Y.
- Li R., Guo P., Baumz M., Grando S., Ceccarelli S.** (2006) Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China*, **5**, 751-757.
- Lian H.L., Yu X., Ye Q., Ding X., Kitagawa Y., Kwak S.S., Su W.A., Tang Z.C.** (2004) The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 481-489.
- Lisenbee C.S., Lingard M.J., Trelease R.N.** (2005) Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. *The Plant Journal*, **43**, 900-914.

- Liu F., Jensen C.R., Andersen M.N.** (2003) Hydraulic and chemical signals in the control of leaf expansion and stomatal conductance in soybean exposed to drought stress. *Functional Plant Biology*, **30**, 65-73.
- Liu X., Yue Y., Li B., Nie Y., Li W., Wu W.H., Ma L.** (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science*, **315**, 1712-1716.
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lorenzo O., Solano R.** (2005) Molecular players regulating the jasmonate signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 532-540.
- Maeshima M.** (2001) Tonoplast transporters: organization and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 469-497.
- Maurel C.** (2007) Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Letters*, **581**, 2227-2236.
- Maurel C., Santoni V., Luu D.-T., Wudick M.M., Verdoucq L.** (2009) The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 690-698.
- Merlot S., Leonhardt N., Fenzi F., Valon C., Costa M., Piette L., Vavasseur A., Genty B., Boivin K., Müller A., Giraudat J., Leung J.** (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H(+)-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *The EMBO Journal*, **26**, 3216-3226.
- Miller G., Suzuki N., Rizhsky L., Hegie A., Koussevitzky S., Mittler R.** (2007) Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology*, **144**, 1777-1785.
- Mitra R., Bhatia C.R.** (1973) Repeated and non-repeated nucleotide sequences in diploid and polyploid wheat species. *Heredity*, **31**, 251-262.
- Mittova V., Volokita M., Guy M., Tal M.** (2000) Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, **110**, 42-51.
- Mizuno T.** (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction. *Journal of Biochemistry*, **123**, 555-563.
- Mohammadi M., Kav N.N., Deyholos M.K.** (2007) Transcriptional profiling of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) roots identifies novel, dehydration-responsive genes. *Plant, Cell and Environment*, **30**, 630-645.
- Mohammadi M., Kav N.N., Deyholos M.K.** (2008) Transcript expression profile of water-limited roots of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* 'Opata'). *Genome*, **51**, 357-367.
- Morillo S.A., Tax F.E.** (2006) Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 460-469.
- Nambara E., Marion-Poll A.** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 165-185.

- Neill S., Burnett E., Desikan R., Hancock J.** (1998) Gene note. Cloning of a wilt-responsive cDNA from an *Arabidopsis thaliana* suspension culture cDNA library that encodes a putative 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 1893-1894.
- Niemietz C.M., Tyerman S.D.** (1997) Characterization of water channels in wheat root membrane vesicles. *Plant Physiology*, **115**, 561-567.
- Noctor G., Foyer C.H.** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 249-279.
- Obara K., Sumi K., Fukuda H.** (2002) The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of Arabidopsis putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **43**, 697-705.
- Ota I.M., Varshavsky A.** (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*, **262**, 566-569.
- Pierleoni A., Martelli P.L., Fariselli P., Casadio R.** (2006) BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, **22**, e408-e416.
- Potokina E., Sreenivasulu N., Altschmied L., Michalek W., Graner A.** (2002) Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional & Integrative Genomics*, **2**, 28-39.
- Prokic L., Jovanovic Z., McAinsh M.R., Vucinic Z., Stikic R.** (2006) Species-dependent changes in stomatal sensitivity to abscisic acid mediated by external pH. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 675-683.
- Puhakainen T., Hess M.W., Makela P., Svensson J., Heino P., Palva E.T.** (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, **54**, 743-753.
- Qin X., Zeevaart J.A.** (1999) The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 15354-15361.
- Ried J.L., Walker-Simmons M.K.** (1993) Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*, **102**, 125-131.
- Reyes J.L., Rodrigo M.J., Colmenero-Flores J.M., Gil J.V., Garay-Arroyo A., Campos F., Salamini F., Bartels D., Covarrubias A.A.** (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment*, **28**, 709-718.
- Santiago J., Dupeux F., Round A., Antoni R., Park S.Y., Jamin M., Cutler S.R., Rodriguez P.L., Márquez J.A.** (2009) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, **462**, 665-668.
- Scandalios J.G.** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, **101**, 7-12.
- Scandalios J.G.** (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**, 995-1014.

- Schachtman D.P., Goodger J.Q.D.** (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, **13**, 281-287.
- Schaller F.** (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 11-23.
- Schweighofer A., Hirtand H., Meskiene I.** (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *TRENDS in Plant Science*, **9**, 236-243.
- Seo M., Koiwai H., Akaba S., Komano T., Oritani T., Kamiya Y., Koshiba T.** (2000) Absciscic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **23**, 481-488.
- Sharma P., Dubey R.S.** (2007) Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, **26**, 2027–2038.
- Shen Y.Y., Wang X.F., Wu F.Q., Du S.Y., Cao Z., Shang Y., Wang X.L., Peng C.C., Yu X.C., Zhu S.Y., Fan R.C., Xu Y.H., Zhang D.P.** (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, **443**, 823-826.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K.** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1305-1319.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2006) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 221-227.
- Small I., Peeters N., Legeai F., Lurin C.** (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, **4**, 1581-1590.
- Sreenivasulu N., Altschmied L., Panitz R., Hähnel U., Michalek W., Weschke W., Wobus U.** (2002) Identification of genes specifically expressed in maternal and filial tissues of barley caryopses: a cDNA array analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, **266**, 758-767.
- Stitt M., Gibon Y., Lunn J.E., Piques M.** (2007) Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. *Functional Plant Biology*, **34**, 526-549.
- Sung D.Y., Guy C.L.** (2003) Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiology*, **132**, 979-987.
- Szűcs A.** (2008) A búzaszemfejlődésben szerepet játszó gének azonosítása bioinformatikai és molekuláris módszerekkel. Ph.D. disszertáció.
- Szűcs A., Jäger K., Jurca M.E., Fábíán A., Bottka S., Zvara Á., Barnabás B., Fehér A.** (2010) Histological and microarray analysis of the direct effect of water shortage alone or combined with heat on early grain development in wheat. *Physiologia Plantarum*, **140**, 174-188.
- Takahama U., Oniki T.** (1992) Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant Cell Physiology*, **33**, 379-387.

- Takahashi N., Goto N., Okada K., Takahashi H.** (2002) Hydrotropism in abscisic acid, wavy, and gravitropic mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **216**, 203-211.
- Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., von Wiren N., Fujiwara T.** (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *The Plant Cell*, **18**, 1498–1509.
- Tan B.C., Schwartz S.H., Zeevaart J.A., McCarty D.R.** (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 12235-12240.
- Tari I., Csiszár J., Gallé Á., Bajkán Sz., Szepesi Á., Vashegyi Á.** (2003) Élettani megközelítések gazdasági növényeink szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. *Botanikai Közlemény*, **90**, 139-158.
- Thompson A.J., Jackson A.C., Parker R.A., Morpeth D.R., Burbidge A., Taylor I.B.** (2000) Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, **42**, 833-845.
- Thompson A.J., Mulholland B.J., Jackson A.C., McKee J.M., Hilton H.W., Symonds R.C., Sonneveld T., Burbidge A., Stevenson P., Taylor I.B.** (2007) Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant, Cell and Environment*, **30**, 67-78.
- Tung S.A., Smeeton R., White C.A., Black C.R., Taylor I.B., Hilton H.W., Thompson A.J.** (2008) Over-expression of *LeNCED1* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with the *rbcS3C* promoter allows recovery of lines that accumulate very high levels of abscisic acid and exhibit severe phenotypes. *Plant, Cell and Environment*, **31**, 968-981.
- Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F., R. Kaldenhoff R.** (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, **425**, 734–737.
- Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K.** (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell*, **11**, 1743-1754.
- Van der Hoorn R.A.** (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 191-223.
- Wan X.R., Li L.** (2006) Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **347**, 1030-1038.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A.** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, **9**, 244-252.
- Wilkinson S., Davies W.J.** (1997) Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermis symplast. *Plant Physiology*, **113**, 559-573.

- Wilkinson S., Davies W.J.** (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*, **25**, 195-210.
- Wilson I.D., Barker G.L.A., Beswick R.W., Shepherd S.K., Lu C., Coghill J.A., Edwards D., Owen P., Lyons R., Parker J.S., Lenton J.R., Holdsworth M.J., Shewry P.R., Edwards K.J.** (2004) A transcriptomics resource for wheat functional genomics. *Plant Biotechnology Journal*, **2**, 495-506.
- Winfield M.O., Lu C., Wilson I.D., Coghill J.A., Edwards K.J.** (2010) Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal*, **8**, 749-771.
- Wohlbach D.J., Quirino B.F., Sussman M.R.** (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *The Plant Cell*, **20**, 1101-1117.
- Xiang Y., Huang Y., Xiong L.** (2007) Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*, **144**, 1416-1428.
- Xue G.P., McIntyre C.L., Chapman S., Bower N.I., Way H., Reverter A., Clarke B., Shorter R.** (2006) Differential gene expression of wheat progeny with contrasting levels of transpiration efficiency. *Plant Molecular Biology*, **61**, 863-881.
- Yang C.Y., Chen Y.C., Jauh G.Y., Wang C.S.** (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **139**, 836-846.
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Liu L.** (2003) Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant Cell and Environment*, **26**, 1621-1631.
- Yokoyama, R., Rose, J.K. Nishitani, K.** (2004) A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiology*, **134**, 1088-1099.
- Yoon H.-S., Lee H., Lee I.-A., Kim K.-Y., Jo J.** (2004) Molecular cloning of the monodehydroascorbate reductase gene from *Brassica campestris* and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1658**, 181-186.
- Zelazny E., Borst J.W., Muylaert M., Batoko H., Hemminga M.A., Chaumont F.** (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 12359-12364.
- Zhu B.C., Su J., Chan M.C., Verma D.P.S., Fan Y.L., Wu R.** (1998) Over-expression of a Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water-stress and salt-stress in transgenic rice. *Plant Science*, **139**, 41-48.

11. Publikációs lista

Bírált folyóirat-közlemények

Sečenji M., Hideg É., Bebes A., Györgyey J. (2010a) Transcriptional differences in gene families of the ascorbate–glutathione cycle in wheat during mild water deficit. *Plant Cell Reports*, **29**, 37-50. - **IF: 1.946**

Sečenji M., Lendvai Á., Miskolczi P., Kocsy G., Gallé Á., Szűcs A., Hoffmann B., Sárvári É., Schweizer P., Stein N., Dudits D., Györgyey J. (2010b) Differences in root functions during long-term drought adaptation: comparison of active gene sets of two wheat genotypes. *Plant Biology*, doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00295.x - **IF: 1.944**

Gallé Á., Csiszár J., **Secenji M.**, Guóth A., Cseuz L., Tari I., Györgyey J., Erdei L. (2009) Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, **166**, 1878-1891. - **IF: 2.437**

Egyéb publikációk - könyvfejezetek, konferencia-kiadványok

Fehérné Juhász Erzsébet, Cseuz László, Horváth V. Gábor, Mai Antal, **Maria Secenji**, Sass László, Hideg Éva, Vass Imre, Dudits Dénes, Pauk János. A búzába történő génbeépítés módszerei és a hazai géntechnológiai eredmények a búza szárazságtűrésének javítására. *A búza nemesítésének tudománya*, Szerkesztette: Dudits Dénes, 2006.

Secenji M., Lendvai Á., Hajósne Z., Dudits D., Györgyey J. (2005) Experimental system for studying long-term drought stress adaptation of wheat cultivars. *Acta Biologica Szegediensis*, **49**, 51-52.

Secenji M., Hideg É., Bebes A., Györgyey J. (2008) Transcriptional changes in ascorbate-glutathione cycle under drought conditions. *Acta Biologica Szegediensis*, **52**, 93-94.

Gallé Á., Csiszár J., **Secenji M.**, Tari I., Györgyey J., Dudits D., Erdei L. (2008) Changes of glutathione S-transferase activities and gene expression in *Triticum aestivum* during polyethylene-glycol induced osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*, **49**, 95-96.

Gallé Á., Csiszár J., **Secenji M.**, Tari I., Guóth A., Györgyey J., Erdei L. (2008)
Monitoring the levels of phi and tau group GST genes in wheat cultivars under osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis*, **52**, 95-96.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dudits Dénesnek és Dr. Horváth V. Gábornak, hogy lehetővé tették számomra, hogy a Sejtosztódási és Stresszadaptációs Csoport keretén belül dolgozhassam ezen a témán. Továbbá Hajós Jánosnének, Talpas Krisztinának és Sándor Györgyinek a kísérleti munkában nyújtott messzemenő technikai segítségükért. Köszönettel tartozom Dr. Zvara Ágnesnek (MTA SzBK Funkcionális Genomika Labor) a chip-hibridizáció megvalósításában nyújtott segítségéért, valamint a SZTE TTIK Növénybiológia Intézet dolgozóinak - Prof. Erdei Lászlónak, Dr. Tari Irma tanárnőnek, Dr. Csiszár Jolánnak, Dr. Guóth Adriennek és Gallé Ágnesnek - a munkámhoz szükséges szakmai és gyakorlati tanácsokért. Köszönet a szerzőtársaknak, akik munkájukkal hozzájárultak közös publikációink színvonalához. Továbbá a Sejtosztódási és Stresszadaptációs Csoport minden egyes volt és jelenlegi tagjának a tapasztalatcsereért, a közös munkáért, a jó hangulatért.

Végezetül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Györgyey Jánosnak - Arthúrnak - mind szakmai, mind személyes támogatását, hogy ez a mű megszülethetett.

13. Függelék

1. táblázat. Proteáz aktivitással bíró fehérjéket kódoló, felülszabályozott gének

Egyedi azonosító	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke**							
		Plainsman V				Kobomugi			
		1w	2w	3w	4w	1w	2w	3w	4w
búza*/árpa (nukleinsav- szekvencia hasonlósága %-ban)									
TA98746/HK05C19 (92%)	Feltételezett ubiquitin-1.3 specifikus proteáz	-1.3	-1.4	-2.0	1.0	-1.1	2.5	1.1	-1.3
TA71220/HF01P06 (93%)	TPA: feltételezett cisztein-proteáz	-3.3	-1.3	-1.7	1.1	1.0	1.0	1.3	2.5
TA71220/HK03G06 (93%)	TPA: feltételezett cisztein-proteáz	1.8	1.9	1.7	2.7	1.3	1.1	1.0	2.1
TA55387/HO06N12 (89%)	TPA: feltételezett cisztein-proteáz	2.0	2.5	2.4	2.5	1.2	2.4	1.6	2.4
TA55387/HW01G04 (89%)	TPA: feltételezett cisztein-proteáz	2.7	2.5	2.9	4.7	1.0	2.7	1.7	1.6
TA55387/HP01M06 (89%)	TPA: feltételezett cisztein-proteáz	1.7	2.1	1.7	2.7	1.3	1.2	1.9	1.8
TA56558, TA56491, TA56532/HO12D08 (95, 85, 85%)	kathepszin B szerű cisztein-proteináz	2.0	1.9	1.8	2.0	1.1	-1.4	1.2	1.8
TA56491, TA56531 / HY09E10 (92, 91%)	kathepszin B	1.5	1.7	1.7	2.1	1.2	1.7	1.4	2.1
TA56531, TA56491, TA56504/HV03E14 (92, 91, 91%)	kathepszin B	1.6	-1.7	-1.3	-1.4	1.2	2.1	1.1	2.2
TA56531, TA56491, TA56452/HV01H05 (95, 95, 93%)	kathepszin B	-1.1	1.4	1.1	2.1	-1.1	1.7	1.3	2.1
TA61933/HT02G12 (95%)	C13 endopeptidáz NP1 prekürzora	1.5	1.6	2.4	2.7	1.6	1.6	2.3	2.3

* A búza TA-k esetében az egyedi számazonosító után a taxonazonosító szerepel: 4565.

** A ≥ 2 mértékű változásokat félkövér számokkal emeltük ki.

2. táblázat. Oxidoreduktáz aktivitással bíró fehérjéket kódoló, felülszabályozott gének

Egyedi azonosító	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke**							
		Plainsman V				Kobomugi			
		1w	2w	3w	4w	1w	2w	3w	4w
TA75187/HA08A22 (89%)	Feltételezett 3-izopropilmalát-dehidrogenáz	1.9	2.1	1.8	-1.1	1.1	1.2	-1.3	1.3
TA62679, TA62684/HW06L16 (95, 94%)	NADP-specifikus izocitrát-dehidrogenáz	1.9	2.0	2.1	2.9	1.2	1.0	1.2	1.3
TA72172/HK03F23 (90%)	Feltételezett alkohol-dehidrogenáz	1.8	1.9	1.6	2.5	1.0	1.1	1.0	1.2
TA63504/HT01P04 (94%)	Alkohol-dehidrogenáz	2.1	1.4	1.5	1.2	-1.6	1.4	-2.0	-1.3
TA55236/HY09G05 (94%)	Feltételezett UDP-glükóz-dehidrogenáz	2.5	1.1	1.9	1.0	1.6	1.6	1.4	1.2
TA55294/HS01P12 (90%)	Feltételezett UDP-glükóz-dehidrogenáz	2.0	1.6	2.5	1.5	1.3	-1.3	1.7	1.2
TA55294, TA55215/HY06P11 (90, 89%)	Feltételezett UDP-glükóz-dehidrogenáz	2.8	1.1	2.5	1.5	1.5	2.0	1.5	-1.3
TA56530/HV01J10 (94%)	Citoplazmás malát-dehidrogenáz	1.7	1.3	2.0	2.1	1.5	1.4	1.5	1.2
TA56802, TA56785/HM02H13 (99, 98%)	Feltételezett glioxiszómás malát-dehidrogenáz	-1.1	1.2	1.2	2.0	1.1	-1.1	1.0	1.1
TA90849/HR01P23 (92%)	Feltételezett dehidrogenáz	1.1	1.3	1.0	2.4	-1.3	1.5	1.8	1.1
TA61214, TA61233, TA61229/HU01C13 (97, 97, 94%)	Feltételezett citoszolikus 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz	2.2	1.8	2.2	2.3	1.5	1.8	1.5	1.0
TA61224/HW04J10 (95%)	Feltételezett citoszolikus 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz	2.3	1.9	2.1	2.2	1.0	-1.7	1.0	-1.3
CJ609271/HK03M20 (81%)	Feltételezett glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz	3.8	2.7	3.2	3.0	-1.7	1.0	-1.3	-1.1
TA60117/HO10J17 (97%)	glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz	3.0	3.0	2.9	2.2	1.4	2.1	1.5	1.1

* A búza TA-k esetében az egyedi számazonosító után a taxonazonosító szerepel: 4565.

** A ≥ 2 mértékű változásokat félkövér számokkal emeltük ki.

3. táblázat. Sejtfa-biogenezissel kapcsolatos fehérjéket kódoló, felülszabályozott gének

Egyedi azonosító	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke**							
		Plainsman V				Kobomugi			
		1w	2w	3w	4w	1w	2w	3w	4w
CA644521/HU02G22 (87%)	Feltételezett xiloglükán-endotranszglükóziláz	4.8	1.1	4.1	1.9	1.5	1.6	1.2	1.2
TA53014/HW06N22 (72%)	Xiloglükán-endotranszglükóziláz	2.6	2.3	2.5	1.7	-1.7	-1.3	-1.7	1.1
TA53570, TA53014, TA53556/HE01I24 (96, 96, 96%)	Xiloglükán-endotranszglükóziláz	1.7	1.7	2.0	1.4	1.4	1.3	1.0	1.0
TA56027, TA56014, TA56028/HK04P11 (94, 93, 92%)	Xiloglükán-endotranszglükóziláz	1.7	1.2	2.9	1.8	-1.4	1.6	1.1	-1.1
TA54477/HW05C02 (63%)	Xet3 fehérje	2.5	3.1	4.4	3.4	2.0	1.3	2.0	1.2
TA65421/HU02M06 (86%)	béta-expanzin EXPB4	1.9	1.6	2.0	1.5	1.4	1.4	1.7	1.8
TA66779/HM01F21 (89%)	béta-expanzin 2	2.1	1.5	2.3	1.5	1.0	1.9	-1.3	1.4
TA69380/HR01E04 (88%)	expanzin EXPB7	2.0	2.6	3.0	1.8	1.0	1.7	1.2	1.1
TA65426, TA65436, TA65424/HY02O05 (94, 93, 90%)	expanzin EXPB2	2.0	-1.3	1.5	-1.3	1.1	1.4	1.3	1.1
TA65430/HM03P13 (95%)	expanzin EXPB3	1.1	2.0	1.9	1.8	1.1	1.0	1.7	1.0
TA98014/HD03J23 (65%)	Hidroxi-prolinban gazdag glükoprotein	2.1	2.3	2.3	2.2	1.0	1.6	1.7	1.5
TA75734/HO06H23 (90%)	Hidroxi-prolinban gazdag glükoprotein	2.2	2.1	2.8	1.6	1.4	-1.1	-1.1	-1.3
TA76274/HI02J10 (94%)	Feltételezett hidroxi-prolinban gazdag glükoprotein	1.3	2.3	1.3	1.6	1.4	1.1	1.6	-1.4
TA63414/HK03G24 (95%)	fordítottan glükózilált polipeptid	5.3	4.5	6.1	4.1	1.5	-1.1	1.3	1.1
TA63420/HW06B18 (94%)	fordítottan glükózilált polipeptid	1.7	1.7	2.6	1.4	1.9	1.8	1.7	1.2

* A búza TA-k esetében az egyedi számazonosító után a taxonazonosító szerepel: 4565.

** A ≥ 2 mértékű változásokat félkövér számokkal emeltük ki.

4. táblázat. Peroxidáz aktivitással bíró fehérjéket kódoló, felülszabályozott gének

Egyedi azonosító	Feltételezett funkció	A kontrollhoz viszonyított kifejeződés-változás mértéke**							
		Plainsman V				Kobomugi			
		1w	2w	3w	4w	1w	2w	3w	4w
TA68901/HW03P04 (82%)	Feltételezett peroxidáz	1.7	1.7	3.1	4.4	-1.7	-2.5	-1.3	1.6
TA78524/HW04O10 (75%)	Feltételezett peroxidáz	2.7	2.8	3.3	3.5	1.8	1.5	1.1	1.6
TA62374, TA62362, TA62364/HZ01C02 (91, 90, 89%)	Glutation-peroxidáz szerű fehérje	4.3	1.9	4.0	3.0	1.3	1.6	1.5	1.0
TA56153, TA56112 / HK03C04 (96, 95%)	Tioredoxin-peroxidáz	1.9	1.7	1.9	2.4	1.5	-1.7	1.5	1.0
TA78524/HW02P13 (75%)	Feltételezett peroxidáz	2.9	2.8	3.4	3.1	1.1	1.2	1.5	-1.1
CK162170/HO06L24 (89%)	Feltételezett peroxidáz	4.3	3.4	5.0	2.7	-1.1	2.2	1.7	2.1
TA88456/HR01M21 (77%)	Feltételezett peroxidáz	2.0	1.4	1.4	1.8	1.1	-1.3	1.2	-1.1
TA68004/HW06J19 (81%)	Peroxidáz 1 prekürzora	4.2	3.5	5.1	3.7	1.0	-1.4	1.3	-1.4
CK162629/HA06M1 7 (92%)	Feltételezett peroxidáz	2.9	2.1	3.1	1.7	1.4	2.7	1.4	1.6
TA63975, TA63982 / HT01F03 (95, 95%)	Aszkorbát-peroxidáz	2.2	2.1	2.3	1.9	1.2	2.2	1.5	1.2
TA60109/HV03K15 (98%)	Peroxidáz	3.3	-1.1	2.8	1.2	-5	2.3	-2.5	-1.1

* A búza TA-k esetében az egyedi *szám*azonosító után a taxonazonosító szerepel: 4565.

** A ≥ 2 mértékű változásokat félkövér számokkal emeltük ki.